

**Einfluss von synthetischen Nitromoschusduftstoffen und Substanzen mit
östrogener Wirkung auf ausgewählte Funktionsparameter von Sertoli-
Zellen der Ratte.
Entwicklung und Evaluierung eines In-vitro-Testsystems**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Humanmedizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Kathrin Bittorf
aus Dermbach
Gießen 2005

Aus dem Zentrum für Dermatologie und Andrologie
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Ausbildungszentrum der Europäischen Akademie für Andrologie

Direktor: Prof. Dr. Dr. med. habil. W.- B. Schill

1. Gutachter: PD Dr. Monsees

2. Gutachter: PD Dr. Steger

Tag der Disputation: 08.05.2006

Folgende Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht:

Proceedings:

1. Monsees TK, Hinkel S, Mihm K, Endo F, Schill W-B, Hayatpour J (2001). Effects of environmental hormones on the function of testicular cells. Proceedings of the Second status-seminar "Endocrine Disruptors", Berlin, 02.-04.04.2001. Umwelt Bundesamt Berlin, 133-136
2. Monsees TK, Mihm K, Hinkel S, Endo F, Akaza H, Franz M, Gebhardt S, Pflieger-Bruss S, Schill W-B, Hayatpour J (2001). Effects of xenobiotics on male reproduction. In: Proceedings of the 10th Congress of the European Academy of Dermatology and Venerology, Munich Germany, 10.-14.10.2001; 995-999

Publizierte Abstracts:

- Monsees TK, Mihm K, Hinkel S, Endo F, Franz M, Gebhardt S, Schill WB, Hayatpour J (2001). Influence of xenobiotics on male reproduction. J Eur Acad Dermatol Venerol 15:19

Weitere Abstracts:

- Monsees TK, Hinkel S, Mihm K, Endo F, Schill WB, Hayatpour J (2001). Effects of environmental hormones on the function of testicular cells. Abstract book, p. 43, second status-seminar "Endocrine Disruptors", Berlin, 02.-04.04.2001
- Bittorf K, Henkel R, Hayatpour J, Monsees TK (2005) Effects of Xenoöstrogens on primary rat Sertoli cell functions. Molecular Andrology, Giessen, 07-09.10.2005

Diese Arbeit wurde gefördert durch:

- Umweltbundesamt, Sachgebiet Umweltchemikalien Schadstoffwirkung (Projektnummer: 297 65 001/09)

Hinweis: Die Änderung des Familiennamen Mihm erfolgte durch Heirat.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	3
1.1.	Vorkommen und Wirkung von Xenoöstrogenen, Östrogenen und synthetischen Nitromoschusduftstoffen	12
1.1.1.	Bisphenol-A, Daidzein, 17- α -Ethinylöstradiol, 17 β -Östradiol	12
1.1.2.	Synthetische Nitromoschusduftstoffe Moschus Keton und Moschus Xylol	15
1.2.	Untersuchte Zellparameter (Vitalität (MTT), Laktatproduktion und Inhibin-B-produktion) zur Überprüfung der Wirksamkeit von Östrogenen und Nitromoschusduftstoffen auf Sertoli-Zellen	17
2	Aufgabenstellung	19
3	Material und Methoden	21
3.1.	Verwendete Noxen	21
3.2.	Verwendete Medien	22
3.3.	Präparation der Sertoli-Zellen	23
3.3.1.	Rattenhodenpräparation	23
3.3.2.	Enzymatische Zellisolation	23
3.3.3.	Anlegen der Zellkultur	25
3.3.4.	Behandlung der Zellen mit hypotoner Lösung	25
3.3.5.	Überprüfung der Reinheit der Zellkultur	26
3.4.	Toxikologische Untersuchung der zu testenden Substanzen	28
3.4.1.	MTT-Messung	29
3.4.2.	Laktatbestimmung	29
3.4.3.	Inhibinbestimmung	32
3.4.4.	Proteinbestimmung	35
3.5.	Optimierungen	35
3.6.	Statistik	37
4.	Ergebnisse	38
4.1.	Darstellung der primären Sertoli-Zellkultur nach Präparation, vor und nach Behandlung mit hypotoner Lösung	38
4.2.	Darstellung angefärbter peritubulärer Myoidzellen und Sertoli-Zellen	39
4.3.	Vitalität der Sertoli-Zellen nach Zugabe der zu untersuchenden Substanzen	40
4.4.	Laktatproduktion der Sertoli-Zellen nach Zugabe der zu untersuchenden Substanzen	44
4.5.	Inhibin-B-Sekretion der Sertoli-Zellen nach Zugabe der zu untersuchenden Substanzen	48
5	Diskussion	53
5.1.	Methodische Aspekte	53
5.2.	Diskussion der Ergebnisse	56

6	Zusammenfassung	64
7	Literaturverzeichnis	66
8	Lebenslauf	76
9	Danksagung	77

1 Einleitung:

Die Wirkung von Umweltschadstoffen auf die männliche Reproduktion ist derzeit Gegenstand intensiver Diskussion. Besonders auffallend ist der mehrfach beschriebene markante Rückgang von Spermatozoenzahl und -motilität bei Männern während der vergangenen 30-50 Jahre. Die umfangreichste Arbeit zu diesem Thema zeigt anhand der retrospektiven Metaanalyse von 61 Untersuchungen an einem Gesamtkollektiv von 14947 Männern einen durchschnittlichen Rückgang der Spermienzahl um etwa 50% sowie eine Abnahme des Ejakulatvolumens um etwa 20% innerhalb der letzten 50 Jahre (Carlsen et al., 1992). Im Vergleich zu den 50er Jahren tritt heute Hodenkrebs etwa 2- bis 3mal so häufig auf. Auch stieg die Inzidenz für das Auftreten von Hodenkrebs beispielsweise in Deutschland von 1962 bis 1988 um das Dreifache (Adami et al., 1994). Darüber hinaus wird über eine steigende Zahl von Missbildungen der männlichen Reproduktionsorgane, wie Hypospadie und Kryptorchismus, berichtet (Aitken und Sawyer, 2003).

Beobachtungen bezüglich der Reproduktionsfähigkeit wildlebender Tiere unterstützen die Annahme, dass das gehäufte Auftreten von Missbildungen und Dysfunktionen des männlichen Urogenitaltraktes zumindest teilweise auf Umweltfaktoren anthropogenen Ursprungs zurückzuführen ist (Facemire et al., 1995). Die regelmäßige Präsenz dieser Fragen und Themen in den Medien zeigt, dass es sich dabei um einen Sachverhalt von außerordentlichem gesellschaftlichem Interesse handelt. Ging man lange davon aus, dass die Ursache von Unfruchtbarkeit bei Paaren bei der Frau liegt, so ist mittlerweile anzunehmen, dass in etwa 50% der Fälle die Gründe beim Mann zu suchen sind (Nieschlag, 2000). Diese und weitere Studien haben zu einer breiten wissenschaftlichen und gesellschaftlichen Diskussion über die Umweltfaktoren geführt, die für all diese Phänomene verantwortlich gemacht werden (Boekelheide, 1993).

Eine besondere Rolle scheinen dabei Schadstoffe zu spielen, die über die Nahrungskette, durch die Atemluft oder die Haut in den menschlichen Organismus gelangen. Die Wirkung dieser Schadstoffe auf die Reproduktionsorgane des Mannes steht derzeit im Mittelpunkt des Interesses. Zahlreiche Untersuchungen zeigen eine Schädigung bei Männern, die chronisch solchen Schadstoffen exponiert waren. Der jahrelange Umgang mit dem Pestizid DBCP (1,2-Dibrom-3-Chlorpropan) führte beispielsweise zu Infertilität bei Arbeitern eines Chemieunternehmens in den USA (Eaton et al., 1986). Eine Schädigung der Sertoli-Zellen während der Embryonalphase oder während der Pubertät durch anthropogene Schadstoffe

könnte für einen Teil der beobachteten Effekte verantwortlich sein (Carlsen et al., 1992; Sharpe und Skakkebaek, 1993; Toppari et al., 1996).

Die Entwicklung und morphologische Differenzierung der Samenzellen wird als Spermatogenese bezeichnet und läuft in den Samenkanälchen (Tubuli seminiferi contorti) des Hodens ab. Sie ist ein komplexer Prozess, der nur durch das Zusammenspiel aller Zellpopulationen des Hodengewebes, der somatischen Zellen und der Keimzellen möglich wird. Die wichtigsten somatischen Zellen sind hier die Leydig-Zellen und Sertoli-Zellen. Leydig'sche Zwischenzellen sind die endokrin aktivsten Zellen des Hodens. Die von ihnen, unter dem Einfluss von in der Hypophyse produzierten LH (Luteinisierendes Hormon), freigesetzten Androgene sind essentiell für die Hodenfunktion. Peritubuläre Zellen umgeben die Hodentubuli und tragen so zu deren strukturellen Integrität bei. Getrennt werden diese von den Sertoli-Zellen durch eine Basalmembran. Als „Ammenzellen“ der Spermatogenese besitzen die Sertoli-Zellen eine zentrale Bedeutung bei der Entwicklung der Keimzellen.

Die etwa 500-800 Samenkanälchen sind in etwa 250-350, durch Septen getrennte, Hodenläppchen untergebracht. Die Gesamtlänge der Kanälchen im Hoden eines 30-jährigen Mannes wird auf etwa 300-350 m pro Hoden geschätzt. Die Samenkanälchen münden in das Spaltraumsystem des Rete testis, das zusammen mit zahlreichen Blut- und Lymphgefäßen in einen bindegewebigen Körper (Corpus Highmory) eingeschlossen ist. Aus den Tubuli contorti fließt ein steter Spermatozoen-enhaltender Flüssigkeitsstrom in das Rete testis, dessen Spalträume am oberen Hodenpol Anschluss an die Ductuli efferentes des Nebenhodens haben. Diese sind ca. 10-12 cm lang, stark aufgeknäuelte und münden End-zu-Seit in den Ductus epididymidis, der ebenfalls stark geknäuelte und ca. 5-6 m lang ist. Der Nebenhoden liegt an der Hilusseite dicht am Hoden an und reicht als 5-10 mm dickes, längliches Organ vom kranialen bis zum kaudalen Hodenpol.

Hoden und Nebenhoden sind durch das Skrotum hindurch tastbar und somit der palpatorischen klinischen Untersuchung zugänglich. Mit Hilfe kleiner Bänder ist der Nebenhodenstrang am Boden fixiert. Am kaudalen Hodenpol knickt der Nebenhoden um, zieht nach kranial und geht in den Ductus deferens über. Aufgrund histologischer Untersuchungen lassen sich mehrere Gangabschnitte mit unterschiedlichem Wandaufbau, unterschiedlich weitem Lumen und unterschiedlicher Funktion erkennen (Waites und Gladwell, 1982). Als wesentlicher Teil der ableitenden Samenwege ist der Nebenhoden zugleich auch Samenspeicher und produziert gemeinsam mit dem hochdifferenzierten

Drüsenapparat, Samenblase, Prostata etc. Sekrete, die in ihrer Gesamtheit das notwendige biochemische Milieu für die bei der Ejakulation ausgestoßenen Samenzellen schaffen. Hier werden Nährstoffe zur Verfügung gestellt, um ein vorzeitiges Absterben der Spermien zu verhindern (Weinbauer und Nieschlag, 1993).

Die Tubuli contorti sind mit einem 60-80 µm hohen Keimepithel ausgekleidet und von einer 7-10 µm dicken, myofibrösen Hülle umgeben (Lamina propria). Das Keimepithel besteht aus Keimzellen und Stützzellen, den sogenannten Sertoli-Zellen. Die Keimzellen vermehren sich im Keimepithel und machen die Reifeteilungen durch. Anschließend differenzieren sie sich zu Samenzellen. Die Entwicklung beginnt mit den Spermatogonien, die außen an der Basalmembran der Samenkanälchen liegen, und schreitet über Spermatozyten 1. und 2. Ordnung bis zu den Spermatiden fort, wobei die reifen Spermatiden das Lumen der Kanälchen säumen. Die Keimzellen unterscheiden sich durch einige Merkmale von den allgemeinen Körperzellen. Sie stehen durch Interzellularbrücken miteinander in Verbindung, so dass Zellgruppen gleichen Entwicklungsstadiums und weitgehend identischen genetischen Bestandes resultieren, sog. Klone (Sharpe, 1994). Aus einer Spermatogonie entsteht somit ein Klon von 4 Spermatozyten. In besonders frühen Stadien besitzen die Keimzellen eine elektronenoptisch erkennbare granuläre, osmophile Substanz, die als nuage (Wolke) bezeichnet wird. Um ihren Chromosomensatz auf den haploiden Satz zu reduzieren, machen sie Reifeteilungen (Meiose) durch, mit der gleichzeitigen Möglichkeit, das genetische Material neu zu kombinieren. Während ihrer hochgradigen Differenzierung finden Transformationen der Zellorganellen statt, z.B. die des Golgi-Apperates zum Akrosom. Auf ihrer höchsten Entwicklungsstufe werden sie als funktionstüchtige, freie Zellen aus dem Gewebsverband entlassen.

Sertoli-Zellen sind somatische, im adulten Zustand teilungsinaktive Zellen, die im Keimepithel angesiedelt sind. Sie sind nach ihrem Erstbeschreiber Enrico Sertoli (1842-1910) benannt, der die Zellen wegen ihrer zytoplasmatischen Fortsätze und Ramifikationen 1865 als „cellule ramificate,“ bezeichnete. Diese Zellen sitzen auf der Basalmembran, reichen bis zum Lumen und können, in übertragenem Sinne, als das Stützgerüst des Keimepithels angesehen werden. Entlang den Zellkörpern, die sich über die gesamte Höhe des keimtragenden Epithels erstrecken, verlaufen die morphologische und physiologische Differenzierung und Reifung der Keimzellen bis zum Spermium. Die Sertoli-Zellen koordinieren den Ablauf der Spermatogenese sowohl in topographischer als auch in funktioneller Hinsicht. Dafür spricht

die Produktion und Sekretion einer Vielzahl von Faktoren durch die Sertoli-Zellen: Proteine, Zytokine, Wachstumsfaktoren, Opiode, Steroide, Prostaglandine, Modulatoren der Zellteilung etc. (Waites und Gladwell, 1982). Die Morphologie der Sertoli-Zelle korreliert mit ihren vielfältigen physiologischen Funktionen. Im Zytoplasma finden sich endoplasmatisches Retikulum des glatten (Steroidsynthese) und rauhen Typs (Proteinsynthese), ein prominenter Golgi-Apparat (Verpackung und Transport sekretorischer Produkte), lysosomale Granula (Phagozytose) sowie Mikrotubuli und intermediäre Filamente (Anpassung der Zellform während der verschiedenen Phasen der Keimzellentwicklung) (Weinbauer und Nieschlag, 1993).

Die Sertoli-Zelle hat in dem lumenseitigen Abschnitt des Keimepithels auch mit den Spermatiden besondere Zellkontakte, über die vermutlich ein kontrollierter Stofftransport stattfindet (Sylvester und Griswold, 1995). Sie besitzt auch Ernährungsfunktionen für die reifen Keimzellen. Die Sertoli-Zellen spielen im Hormonmetabolismus eine wichtige Rolle. Sie sind in der Lage Testosteron, mit Hilfe des Enzyms 5α -Reduktase, zu dem stark wirksamen 5α -Dihydrotestosteron (DHT) zu reduzieren (Hiort, 2002). Darüber hinaus sind sie aber auch selbst sekretorisch tätig. Bei der Ratte wurde die Bildung eines Androgen-bindenden Proteins (ABP) nachgewiesen, das für die Kontrolle der Spermatogenese und für die Funktion der ableitenden Samenwege verantwortlich ist (Hinton und Setchel, 1993). Außerdem sezernieren Sertoli-Zellen Inhibin, das die FSH-Ausschüttung aus der Hypophyse hemmt (Robertson et al., 1993). Unreife Sertoli-Zellen haben sogar die Fähigkeit Testosteron in Östradiol umzuwandeln (Carreau et al., 2002).

Da eine Sertoli-Zelle nur eine bestimmte Anzahl von Keimzellen ernähren kann, ist die Anzahl der Sertoli-Zellen der Menge der produzierten Spermatozoen proportional (Johnson et al., 1992). Diese Zahl ist speziesabhängig und beträgt beim Mann etwa 4 Spermien pro Zelle (Schlatt et al., 1995). Im Vergleich dazu liegen die Werte bei der Laborratte um 10. Dies bedeutet, dass innerhalb der Spezies eine höhere Anzahl an Sertoli-Zellen eine größere Produktion an Spermien mit sich bringt.

Faktoren, welche das Proliferationsmuster der Sertoli-Zellen und damit die Hodengröße der Erwachsenen steuern können, werden im Folgenden beschrieben.

In präpubertären Java- und Rhesus-Affen sind die Sertoli-Zellen in geringem Ausmaß teilungsaktiv; deren proliferative Aktivität wird jedoch durch trophische Faktoren wie Androgene und follikelstimulierendes Hormon (FSH) deutlich stimuliert (Schlatt et al., 1995). Dies betrifft sowohl die Anzahl der Sertoli-Zellen als auch die Expression von Zellteilungsmarkern. Die Teilungen der Sertoli-Zellen enden zu Beginn der Pubertät mit dem Auftreten der ersten meiotischen Keimzellen. Zu diesem Zeitpunkt haben die Sertoli-Zellen untereinander „tight junctions“ ausgebildet, die sogenannte Blut-Hoden-Schranke (siehe unten) (Pelletier und Byers, 1992). Bei Laborratten bewirkt die Prolongation der Teilungsphase der Sertoli-Zellen, hervorgerufen durch eine Veränderung im Gleichgewicht der Schilddrüsenhormone, eine Erhöhung des Hodengewichts und der Spermienproduktion um 80% (Haaster et al., 1992). Patienten mit Laron-Zwerg-Syndrom leiden an einer Störung der Schilddrüsenfunktion und haben häufig überdurchschnittlich große Hoden (Hoffmann et al., 1991).

Sertoli-Zellen produzieren und sezernieren Flüssigkeit und bilden dadurch das Tubuluslumen (Waites und Gladwell, 1982). Über 90% der Flüssigkeitsabgabe erfolgt in das tubuläre Lumen. Spezielle Strukturelemente der Blut-Hoden-Schranke verhindern den Rückfluss der sezernierten Flüssigkeit. Der daraus resultierende flüssigkeitsbedingte Druck hält das Lumen aufrecht. In dieser Tubulusflüssigkeit werden auch die Samenzellen transportiert. Die Zusammensetzung der tubulären Flüssigkeit ist im Detail bislang nur bei Ratten bekannt (Hinton und Setchel, 1993). Gegenüber dem Blut enthält die tubuläre Flüssigkeit wesentlich mehr Kaliumionen und entsprechend weniger Natriumionen. Andere Bestandteile sind Carbonat, Magnesium und Chloridionen, Inositol, Glukose, Carnitin, Glyzerylphosphorylcolin, Aminosäuren, Androgene und verschiedene Proteine (Hinton und Setchel, 1993). Damit befinden sich die Keimzellen in einem einzigartigen Flüssigkeitsmilieu.

Im basolateralen Bereich benachbarter Sertoli-Zellen finden sich leistenförmige Memranspezialisierungen („occluding tight junctions“), welche den Interzellularspalt verschließen und somit die Blut-Hoden-Schranke aufbauen. Die Ausbildung dieser Blut-Hoden-Schranke koinzidiert mit dem Beginn der ersten Meiose der Keimzellen (Präleptotän-Zygotän) und dem Arrest der Proliferation der Sertoli-Zellen und existiert in allen bislang untersuchten Spezies. Durch die Blut-Hoden-Schranke wird das Keimepithel in zwei Regionen geteilt, die histologisch und funktionell völlig verschieden sind. Im basalen Bereich befinden sich die frühen Keimzellen und im adluminalen Bereich die weiterentwickelten und

die ausgereiften Keimzellen. Während der Entwicklung der Keimzellen werden diese durch die Blut-Hoden-Schranke regelrecht durchgeschleust. Für die Blut-Hoden-Schranke werden 2 Hauptfunktionen postuliert; die physikalische Isolierung der haploiden und damit antigenen Keimzellen, um deren Erkennung durch das Immunsystem zu verhindern (Prävention einer Autoimmunorchitis) und die Bereitstellung eines speziellen Milieus für den Ablauf der Meiose und der Spermienentwicklung (Pelletier und Byers, 1992). Einige Autoren halten die Bereitstellung eines spezifischen metabolischen Milieus für die entscheidende Rolle der Blut-Hoden-Schranke, da beispielsweise bei saisonal fortpflanzungsaktiven Tieren der Abbau und Wiederaufbau der Schranke nicht von der Entwicklungsphase der Keimzellen, sondern eher mit der Aktivität der Sertoli-Zellen zusammenhängt (Pelletier und Byers, 1992).

Die Ausbildung der Blut-Hoden-Schranke und deren Selektivität im Ausschluss von Molekülen bedingt, dass für die, im adluminalen Kompartiment lokalisierten Zellen, kein direkter Zugang zu Metaboliten aus der Peripherie oder aus dem Interstitium besteht. Damit sind diese Keimzellen auf eine Versorgung ausschließlich durch die Sertoli-Zellen angewiesen. Diese „Ernährungsfunktion“ kann wahrscheinlich über unterschiedliche Mechanismen erfolgen: selektiver Transport und Transzytose sowie Synthese und vektorielle Sekretion. So erfolgt die Versorgung der Keimzellen mit Eisen über selektiven Transport und Transzytose von Transferrin (Sylvester und Griswold, 1995). Synthese und vektorielle Sekretion wurde für eine Reihe von Substanzen beschrieben: beispielsweise das androgenbindende Protein, ein Produkt der Sertoli-Zelle, das sich jedoch auch in Keimzellen und sogar im Lumen des Nebenhodens findet; die Hormone Inhibin und Aktivin; und Plasminogenaktivator, eine proteolytische Substanz, die wahrscheinlich an der Freisetzung der Samenzellen in das Tubulusslumen beteiligt ist (Weinbauer und Nieschlag, 1992).

Die Produktion von Laktat, als wichtigsten Energieträger für die sich entwickelnden Keimzellen, stellt eine wesentliche metabolische Funktion der Sertoli-Zelle dar. Bei der Untersuchung von Morphologie, Sauerstoffverbrauch und Proteinsynthese der Spermatozyten und Spermatiden zeigte sich eine direkte Abhängigkeit dieser Parameter vom Laktatangebot in der Umgebung. Laktatmangel führt zu frühzeitiger Degeneration und irreversiblen Abfall der Proteinsynthese, während sich bei ausreichender Laktatproduktion keine Veränderung dieser Messgrößen einstellt (Jutte et al., 1981).

Eine Vielzahl von Stoffen führt zu einer Stimulation der Laktatproduktion durch die Sertoli-Zellen. Dazu gehört nicht nur das FSH, sondern auch z.B. cAMP, Insulin, IGF-I, EGF und

TGF- β (Jutte et al., 1981). Alle diese Stoffe werden schon unter physiologischen Bedingungen in mehr oder weniger großen Mengen vom Körper produziert und haben damit Einfluss auf die Spermatogenese. FSH wird in der Hypophyse produziert und erreicht über das Blut den Hoden und somit die Sertoli-Zellen, die im Hodengewebe die einzige Zellart sind, die in nachweisbarer Größenordnung FSH Rezeptoren besitzen (Fakunding et al., 1976). FSH steigert dadurch die metabolische Aktivität der Sertoli-Zellen. Die Vermittlung der Wirkung vollzieht sich dabei über die Aktivierung der Adenylatcyclase und die Produktion von cAMP (Fakunding et al., 1976; Steinberger et al., 1978).

Die enzymatische Ausstattung der Sertoli-Zellen umfasst neben den für die Laktatproduktion entscheidenden Enzymen der Glykolyse (unter anderem verschiedene LDH-Isoenzyme) auch die Alkalische Phosphatase, die Creatinkinase und die Gamma-Glutamyl-Transpeptidase (GGT) (Carreau et al., 1996). Die GGT scheint dabei in Hinblick auf die im Hoden vorkommenden Zellpopulationen recht spezifisch für die Sertoli-Zellen zu sein (Carreau et al., 1996). Durch die Abgabe verschiedener Proteine u.a. Transferrin (Skinner und Griswold, 1980), Plasminogen Aktivator (Lacroix et al., 1977), Androgen-Binding-Protein (ABP; Fritz et al., 1974) und Inhibin (Moore et al., 1993) zeigt sich die sekretorische Leistung dieser Zellen. ABP, das zur Vermittlung der Androgenwirkung im Hodengewebe notwendig ist, wurde in zahlreichen Studien als Sertoli-Zell Marker beschrieben. Ein Abfall der ABP Produktion wurde dabei als Indikator für eine gestörte Sertoli-Zell Funktion angesehen (Chapin et al., 1988).

Das Wissen um die parakrine Funktion der Sertoli-Zellen, also insbesondere ihre Interaktion mit den Keimzellen oder auch den Leydig-Zellen via Botenstoffe, ist insgesamt gesehen allerdings noch sehr lückenhaft. Während die einzelnen Sekretionsprodukte und deren Produktionsort bekannt ist, weiß man doch sehr wenig über die Wirkungsmechanismen.

Zur Verdeutlichung der oben genannten Interaktionen zwischen Sertoli-Zellen, Leydig-Zellen und Keimzellen soll das in Abbildung 1 dargestellte Schema dienen:

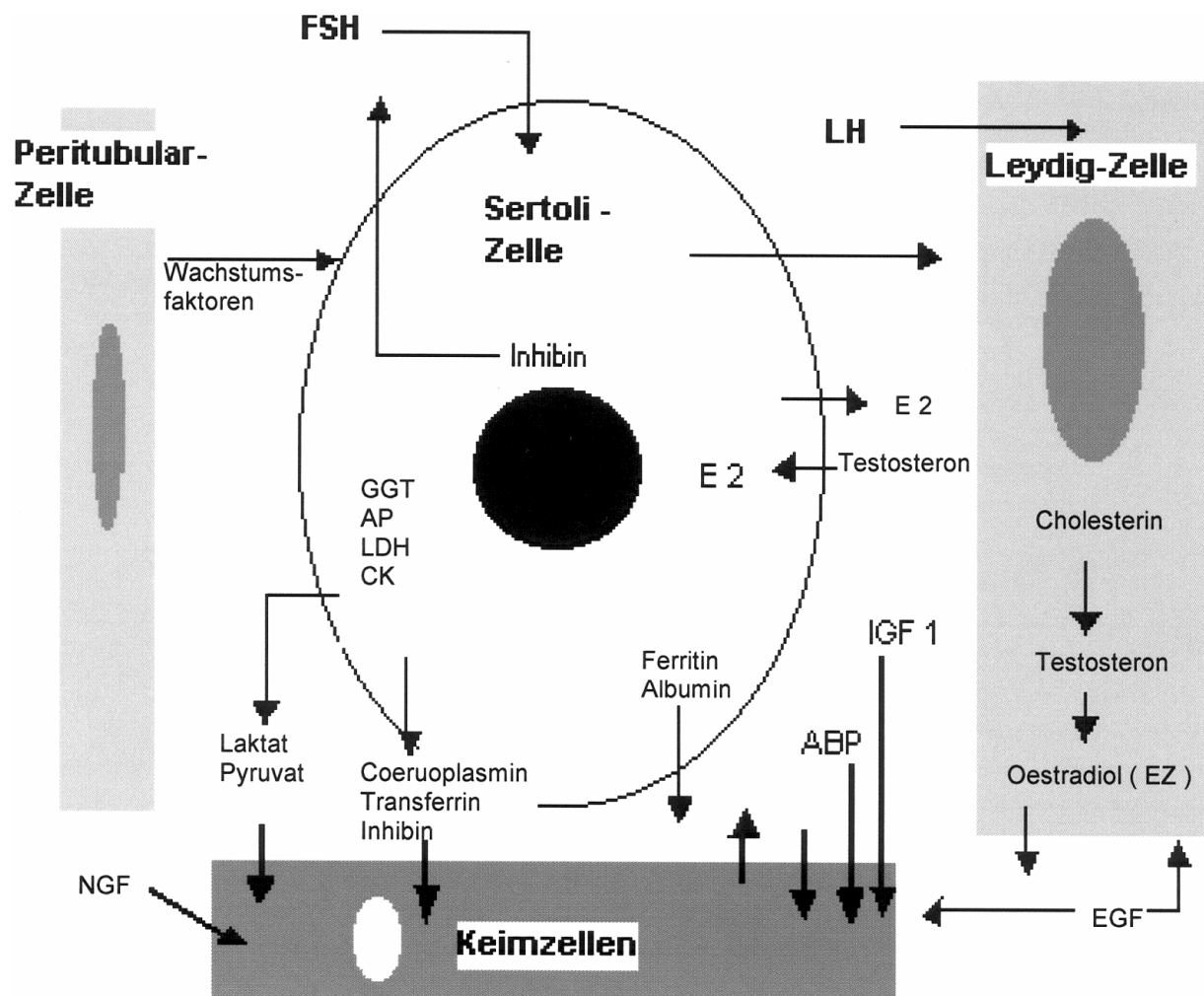


Abb.1: Schema der „cell-to-cell“ Interaktionen im menschlichen Hoden (aus: Carreau, 1995) ABP=Androgenbindendes Protein; NGF=Nervaler Wachstumsfaktor; EGF=Epidermaler Wachstumsfaktor; IGF=Insulinähnlicher Wachstumsfaktor; LDH=Laktatdehydrogenase; AP=Alkalische Phosphatase; CK=Kreatinkinase; GGT=Gammaglutamyltranspeptidase

Die Zellen selbst produzieren das Hormon Inhibin, das durch einen negativen Feedback-Mechanismus zu einer Abnahme der Gonadotropin Produktion in der Hypophyse führt (Moore et al., 1993). FSH führt demzufolge zu einer Steigerung der Inhibinsekretion der Sertoli-Zellen (in vitro um etwa 40%; Carreau, 1995). Die chemische Struktur des Inhibins ist seit etwa zehn Jahren bekannt (Eramaa et al., 1992).

Inhibin ist ein Polypeptidhormon, welches aus zwei verschiedenen, durch Disulfidbrücken verbundenen Untereinheiten, besteht (α -Untereinheit und entweder β A-Untereinheit oder β B-Untereinheit). Die α -Kette ist bei beiden Inhibin-Formen identisch, die β -Kette unterscheidet Inhibin-A und Inhibin-B voneinander). Inhibin wird vom Ovar der Frau und Sertoli-Zellen des Mannes sezerniert. Es unterdrückt selektiv die Sekretion von FSH (Follikel-stimulierendes-Hormon) und hat lokale Wirkung in den Gonaden. Dadurch spielt es eine große Rolle in der männlichen und weiblichen Reproduktionsphysiologie. Während des Menstruationszyklus der Frau steigt und fällt es z.B. unterschiedlich in den einzelnen Phasen (Moore et al., 1993).

Es existiert jedoch noch eine weitere Substanz aus den oben genannten Strukturen, deren Wirkung der des Inhibins entgegengesetzt ist, das Aktivin. Es entsteht durch die Kombination zweier Beta-Untereinheiten und existiert daher in drei möglichen Formen: β A/ β A; β A/ β B und β B/ β B (Moore et al., 1993). Aktivin führt zur Stimulation der FSH-Produktion von hypophysären Zellen, sowohl in-vitro (Ling et al., 1986) als auch in-vivo (McLachlan et al., 1989). Inhibin und Aktivin scheinen zudem entscheidende Bedeutung in der parakrinen Regulation der Spermatogenese zu haben (Mather et al., 1992). Beide führen zur Modulation der Funktion der interstitiellen Zellen und zum Anstieg der Spermatogonienproliferation in-vitro (Moore et al., 1993).

Eine Schädigung der Sertoli-Zellen könnte somit für einen Teil der beobachteten negativen Effekte auf die männliche Fertilität verantwortlich sein. Unterschiedliche Substanzen wurden in den letzten Jahren auf ihren Einfluss auf die Sertoli-Zell-Funktion hin untersucht. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf sogenannte Umweltgifte gelegt, d.h. Stoffe anthropogenen Ursprungs, die teils bei industriellen Prozessen freigesetzt, teils als Inhaltsstoffe von Verpackungsmaterialien verwendet werden oder aber als Pestizide bzw. Herbizide in die Umwelt gelangen und dort aufgrund ihrer oft inerten chemischen Zusammensetzung in den Nahrungsketten und im menschlichen Organismus kumulieren (Nolte et al., 1994; Pont und Albrecht, 1997; Schuurs, 1999; Monsees et al., 2000). Zu diesen Substanzen gehören beispielsweise Schwermetalle wie Cadmium, Quecksilber oder Blei aber auch Phthalatester, chlorierte Kohlenwasserstoffe und Nitroaromate (Nolte et al., 1994). Stachel et al. (1989) hatten das Vorkommen dieser und anderer Umweltschadstoffe in der Samenflüssigkeit nachgewiesen und stellten einen Zusammenhang zwischen deren Konzentration und beruflicher Exposition bzw. außergewöhnlicher Umweltbelastung her.

1.1. Vorkommen und Wirkung von Xenoöstrogenen, Östrogenen und synthetischen Nitromoschusduftstoffen

1.1.1. Bisphenol-A, Daidzein, 17 α -Ethinylöstradiol, 17 β -Östradiol

Beobachtungen bezüglich der Reproduktionsfähigkeit wildlebender Tiere erhärten die Annahme, dass das gehäufte Auftreten von Missbildungen und Dysfunktionen des Urogenitaltraktes männlicher Individuen verschiedener Spezies zumindest teilweise auf Umweltfaktoren anthropogenen Ursprungs zurückzuführen ist. In Florida, USA, ist bei wildlebenden Panthern vermehrt Hodenhochstand und eine verminderte Qualität der Spermien zu verzeichnen (Facemire et al., 1995). Ebenso zeigen die dort lebenden Alligatoren Anzeichen einer Feminisierung, wie z.B. das gehäufte Auftreten von verkürzten Penissen. Eine erhöhte Exposition gegenüber Xenoöstrogenen wird hierbei als mögliche Ursache diskutiert (Colborn, 1995). Bei männlichen Fischen, die im Abflussbereich von Kläranlagen in England leben, wurde die Synthese von Vitelloginen nachgewiesen (Copeland et al., 1986). Diese Eidotterproteine werden normalerweise in der Leber weiblicher Fische unter Östrogeneinfluss synthetisiert und gelten als Bioindikator für eine Belastung mit Xenoöstrogenen. Über eine Feminisierung männlicher Nachkommen nach Belastung mit Xenoöstrogenen wird auch bei Schildkröten, Vögeln und Fledermäusen berichtet (Skakkebaek, 1995).

Als Umwelthormone oder endokrine Modulatoren werden Chemikalien bezeichnet, die entweder wie körpereigene Hormone wirken oder aber deren Wirkung antagonisieren können. Xenoöstrogene, also endokrine Modulatoren mit östrogenen Wirkung, stehen im Verdacht, für bestimmte Reproduktions- und Entwicklungsstörungen bei Tieren sowie für einen Rückgang der Spermatozoenzahlen bei Säugern, einschließlich des Mannes, verantwortlich zu sein (Carlsen et al., 1992; Sharpe und Skakkebaek, 1993; Toppari et al., 1996). Da jede Sertoli-Zelle nur eine definierte Anzahl von Keimzellen versorgen kann, ist die Menge der gebildeten Spermatozoen proportional zur Zahl der Sertoli-Zellen. Xenoöstrogene können bei embryonalen oder juvenilen Laborratten die FSH-Sekretion aus der Hypophyse vermindern und so die von diesem Hormon abhängige Teilungsrate der Sertoli-Zellen reduzieren (Sharpe et al., 1995). Das Xenoöstrogen Bisphenol-A und das Phytoöstrogen Daidzein haben eine um Zehnerpotenzen niedrigere Östrogenwirkung als das natürliche Hormon Östradiol. Daher ist jeder Einzelstoff für sich betrachtet bei der heutigen Exposition vermutlich für die Reproduktionsfähigkeit humaner Fortpflanzungsorgane tolerabel (Schäfer et al., 1996). Eine

additive oder gar synergistische Wirkung mehrerer Östrogen-wirkender Substanzen kann aber nicht ausgeschlossen werden.

Xenoöstrogene binden in vitro und in vivo an Östrogenrezeptoren in Zielorganen wie Uterus, Brustdrüse etc. Östrogenrezeptoren werden aber auch in testikulären Leydigzellen exprimiert. Xenoöstrogene verdrängen in unterschiedlichem Ausmaß die endogenen Östrogene und beeinflussen damit das endokrine hormonelle Gleichgewicht (Korach et al., 1988; Thierfelder, 1995). Diese experimentell-toxikologischen Untersuchungen machen deutlich, dass Chemikalien mit östrogenartiger oder antiandrogener Wirkung eine mögliche Ursache für die beobachtete zunehmende Anzahl von Störungen der männlichen Fertilität darstellen können.

Bei einigen expositionsrelevanten Stoffen mit nachgewiesener östrogenen Aktivität ist bereits ein negativer Einfluss auf die männliche Fertilität nachgewiesen. Ein Beispiel ist Bisphenol-A. In vivo führt Bisphenol-A bei männlichen Ratten zu geringen morphologischen Änderungen des Reproduktionstraktes und zu einer Verringerung der Spermienproduktion (Vom Saal et al., 1998; Fisher et al., 1999; Welshons et al., 1999). Hardin et al. (1981) zeigten ein teratogenes Potential von Bisphenol-A nach Applikation an trächtigen Ratten. Das Xenoöstrogen Bisphenol-A z.B. wird aus der Plastikinnenverkleidung von Konserven- und Getränkedosen freigesetzt und durchschnittlich mit einer Konzentration von etwa 1 µg/kg (\cong 4,4 nmol/l) Körpergewicht pro Tag mit der Nahrung aufgenommen.

Daidzein dagegen bewirkt in vitro DNA-Schäden bei humanen Spermatozoen (Anderson et al., 1997). Das Isoflavon Daidzein kommt vorwiegend in Sojabohnen und daraus hergestellten Lebensmitteln vor. Die individuelle Exposition gegenüber Daidzein hängt von den Ernährungsgewohnheiten ab und ist wahrscheinlich in Japan wesentlich höher als in den USA. Eine Arbeit beschreibt den Nachweis von Daidzein im Urin des Menschen und diskutiert den theoretischen Einfluss auf die Fertilität (Bannwart et al., 1984). Bei peripubertären Rhesus-Affen ergaben Versuche mit spezieller Nahrung (mit/ohne Phytoöstrogene wie Daidzein und Genistein) keinen Einfluss auf den Plasmaspiegel der Sexualhormone oder auf die Organgewichte (Anthony et al., 1996).

Nach pränataler Exposition mit Ethinylöstradiol zeigten männliche Mäuse Atrophien der Samenkanälchen und Hyperplasien der Leydig-Zellen (Yasuda et al., 1988). Bei 7 von 10 transsexuellen Männern (Phänotyp Mann, XY Sexchromosom), die über 6-13 Jahre mit

Östrogenen wie Ethinylöstradiol behandelt wurden, kam es zum Erliegen der Spermatogenese und zur Verminderung der Zahl der Leydig-Zellen. Die drei anderen hatten eine fokale oder normale Spermatogenese (Thiagaraj et al., 1987).

Ethinylöstradiol ist ein Hauptbestandteil oraler Kontrazeptiva und gelangt über die Körperausscheidungen auch in das Trinkwasser, wo Dosen bis 22 ng/l nachgewiesen wurden (Rurainski et al., 1977). Neuere Untersuchungen zeigten, dass die Summe von freiem und konjugiertem Ethinylöstradiol im Oberflächenwasser bei maximal 2,5 ng/l liegt (Kalbfus, 1998). Dies sind relativ niedrige Mengen im Vergleich zu den in der Therapie üblichen Dosen an Steroidhormonen. Bei oralen Kontrazeptiva liegen diese bei Ethinylöstradiol zwischen 10-50 µg pro Tag.

Eine weitere Stoffgruppe, mit Wirkung auf Sertoli-Zellen, sind die Phthalate, die in großen Mengen als Weichmacher in Kunststoffen vorkommen. Sertoli-Zellen sind ein primäres Ziel von Phthalatestern. In Tierexperimenten (Ratte, Maus, Meerschweinchen) führten, über die Nahrung aufgenommene Phthalatester, zu spezifisch im Testis auftretenden histopathologischen Veränderungen, wie tubuläre Atrophie. Nach drei Wochen wurde eine reduzierte Fertilität beobachtet (Lindstrom et al., 1988). In testikulären Zellkulturen führten Phthalatester zu konzentrations-abhängigen (0,1-100 µM) Veränderungen in der Ultra-Struktur sowie in der sekretorischen und biochemischen Funktion von Sertoli-Zellen (Boekelheide, 1993) als auch von Leydig-Zellen (Jones et al., 1993).

Alkylphenole, die als Additive für Kunststoffe eingesetzt werden, besitzen im Vergleich zu anderen Xenoestrogenen ein relativ hohes östrogenes Potential (White et al., 1994). Wird Oktylphenol (0,01-1 mg/l), Butyl-Benzylphthalate (1mg/l) oder Diethylstilbestrol (0,1 mg/l) männlichen Ratten während der ersten 2-12 Lebenstage verabreicht, zeigen diese später eine reduzierte Testesgröße sowie eine verringerte tägliche Spermatozoenproduktion (Sharpe et al., 1995).

1.1.2. Synthetische Nitromoschusduftstoffe Moschus Keton und Moschus Xylol

Natürlicher Moschus ist ein stark riechendes Sekret der exokrinen Duftdrüsen des männlichen Moschustieres (*Moschus moschiferus*). Neben der Markierung des Territoriums dient Moschus zur Anziehung der weiblichen Artgenossen. Bereits im Altertum erlangte der natürliche Moschus große Bedeutung. Er galt als wirksames Aphrodisiakum und als Arzneimittel bei Fieber, Krämpfen, Keuchhusten und anderen Erkrankungen. Des Weiteren fand er bereits damals als Duftstoff bei der Parfümherstellung Verwendung. Natürlicher Moschus ist sehr kostbar, da die exokrinen Drüsen eines Moschustieres nur etwa 30-50 Gramm der Substanz enthalten.

Der Chemiker Albert Baur entdeckte 1888 bei der Suche nach neuen Sprengstoffen zufällig, dass bestimmte nitrierte Benzolderivate Moschusgerüche mit bemerkenswert niedrigen Geruchsschwellenwerten entfalten. Diese di- und tri-Nitro-substituierten Aromaten zeichnen sich durch eine preiswerte und einfache, jedoch das Abwasser belastende, Herstellung aus. Im Laufe des 20. Jahrhunderts fanden diese Substanzen als Vertreter der ersten Generation der Moschus-Ersatzstoffe in der Parfüm-, Waschmittel- und Kosmetikindustrie vielfach Verwendung. Synthetische Moschusduftstoffe besitzen in den Produkten keine reinigenden oder pflegenden Eigenschaften, sondern erfüllen ausschließlich ästhetische Bedürfnisse. Bei der Anwendung in Waschmitteln, Reinigern und Kosmetika gelangen sie über das Abwasser in großen Mengen in die Umwelt. Sie sind biologisch schlecht abbaubar und werden in Kläranlagen nur teilweise zurückgehalten.

Yamagishi et al., (1981) entdeckten erstmals Vertreter der Nitro-Moschusverbindungen in japanischen Gewässerproben. Bis heute sind synthetische Moschusduftstoffe sowohl in allen Umweltkompartimenten als auch in tierischen und humanen Geweben, im Blut und in der Muttermilch, nachgewiesen worden (Liebl und Ehrenstorfer, 1993; Fooker et al., 1997; Rimkus et al., 1999; Liebl et al., 2000). Moschus Xylol (MX, Abb.2) und Moschus Ketone (MK, Abb.2) sind die ökonomisch bedeutsamsten Vertreter der Stoffklasse der Nitro-Moschusverbindungen (UBA-Pressemitteilung Nr. 14/00). MX verbreitet einen süßlichen Duft und hat, die unter Produktionsgesichtspunkten, wertvolle Eigenschaft, wegen seiner geringen Flüchtigkeit, für andere Duftstoffe als Fixativ und Stabilisator zu fungieren. Der lang anhaltende Duft hat die größte Bedeutung in der Parfümierung von Waschpulver und Reinigungsmitteln. MK ist für das pudrige Aroma vieler bekannter Parfüms verantwortlich und findet außerdem breite Anwendung in Kosmetikprodukten.

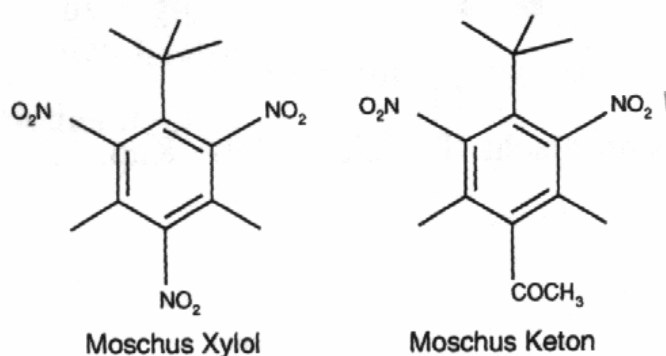


Abb. 2: Strukturen des Moschus Keton und Moschus Xylol

Strukturell sind die synthetischen Nitromoschusverbindungen nicht mit dem natürlichen Moschus verwandt. Natürliche Moschusverbindungen sind makrozyklische Ketone, Alkohole und Pyridinderivate. Demgegenüber sind Nitromoschusverbindungen nahezu vollständig substituierte di- und tri-Nitrobenzolverbindungen, die sich durch Nitrierung der entsprechenden Aromaten herstellen lassen.

Die bisherigen Erkenntnisse belegen den persistenten und lipophilen Charakter der synthetischen Moschusduftstoffe. Sie besitzen ein hohes Bioakkumulationspotential in Fischen und anderen aquatischen Organismen (Rimkus und Brunn, 1996; Heberer et al., 1999). Dies bedeutet, dass auch kleine, kontinuierlich in die Umwelt abgegebene Stoffmengen in Lebewesen angereichert werden können und sich über die Nahrungskette in vergleichsweise hohen Konzentrationen in Tieren und Menschen wiederfinden (Heberer et al., 1999). Derzeit liegen für viele der synthetischen Moschusduftstoffe noch keine vollständigen Bewertungen ihres toxikologischen Potentials für Mensch und Umwelt vor. Nachgewiesen wurde jedoch, dass besonders die Nitro-Moschusduftstoffe Moschus Xylol und Keton allergische Reaktionen hervorrufen können. Aufgrund der hohen Fettlöslichkeit dieser Substanzen liegt die Vermutung nahe, dass sie direkt über die Haut in den Körper gelangen, wenn kosmetische Produkte verwendet werden oder Waschmittelrückstände an der Kleidung mit der Haut in Berührung kommen. In Tierversuchen wurde eine „gute“ dermale Aufnahme des Moschus Xylol bereits nachgewiesen (Hawkins und Ford, 1999). Moschus Keton und Moschus Xylol scheinen nicht östrogen wirksam zu sein, wohl aber die Metabolite von Moschus Xylol (Chou und Dietrich, 1999a, b; Christian et al., 1999; Siol, 2002).

Moschus Xylol induzierte in Fütterungsversuchen mit Ratten, Lebertumore (Goodman et al., 1991). Moschus Xylol kann ferner verschiedene, zum Fremdstoffmetabolismus gehörende Enzymsysteme, aktivieren (Goodman et al., 1991). Eine Abschätzung über die Langzeit-Giftigkeit für Mensch und Tier ist derzeit aber noch nicht möglich (Käfferlein und Angerer, 2000). Eine strukturelle Verwandtschaft besteht zwischen den Nitromoschusduftstoffen und den Sprengstoffen TNT, Hexyl und Pikrinsäure, deren öko-toxikologisches Potential bereits belegt ist (Krass, 1997). Ferner sind die Nitromoschusduftstoffe einigen nitroaromatischen Herbiziden (Pendimethalin und Trifluralin) ausgesprochen ähnlich.

Im Jahr 1979 wurden erstmals im Bezug auf die Nitromoschusduftstoffe gesundheitliche Bedenken geäußert. Moschus Ambrette (MA), ein weiterer Vertreter dieser Stoffgruppe, erwies sich als Auslöser von Photoallergien und seine Verwendung in der Kosmetikindustrie wurde 1996 verboten. Aber auch für die anderen Vertreter der Nitromoschusduftstoffe wurden sporadisch beunruhigende Daten veröffentlicht. Seit Mitte der 90'er Jahre ist die Verwendung der mittlerweile als persistent und toxikologisch bedenklich geltenden Nitromoschusverbindungen im europäischen Raum rückläufig, in den USA und Kanada (Gatermann et al., 1999) hingegen nicht.

1.2. Untersuchte Zellparameter (Vitalität, Laktatproduktion und Inhibinproduktion) zur Überprüfung der Wirksamkeit von Östrogenen und Nitromoschusduftstoffen auf die Sertoli-Zellen

Zur Messung der Vitalität wurde der MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]-Assay gewählt, da er eine relativ sensitive Methode ist, um die Zytotoxizität der getesteten Substanzen auf die Sertoli-Zelle zu ermitteln.

Als metabolischer Parameter wurde die Laktatproduktion der Zellen bestimmt. Laktat ist ein Nebenprodukt des Kohlenhydrat-Stoffwechsels und wird zusammen mit Pyruvat von den Sertoli-Zellen als lebensnotwendiges Produkt an die Keimzellen geliefert. Die Laktat- und Pyruvatwerte sind z.B. ein Indikator für die Schwere von Kreislaufversagen. Es sind verschiedene Typen der Laktatazidose bekannt, die in Verbindung mit Gewebhypoxie, systemischen Störungen sowie angeborenen Stoffwechselstörungen auftreten können (Field et al., 1966; Frommer, 1983). Der Laktatstoffwechsel sowie der Sauerstoffverbrauch im Anschluss an körperliche Betätigung wurden bereits seit 1900 eingehend erforscht (Loomis, 1961; Gloster und Harris, 1962; Marbach und Weil, 1967). Der derzeitige Stand der Wissenschaft besagt, dass der Laktatstoffwechsel unabhängig von den Wegen zu jeder Zeit

stattfindet und daher keine Assoziation mit einer bestimmten VO_2 -Phase im Anschluss an körperliche Betätigung hergestellt werden kann (Gaesser und Brooks, 1984).

Laktat gilt, wie oben bereits angeführt, als bevorzugtes Energiesubstrat für Spermatozyten und Spermatiden (Jutte et al., 1981). Der Nachweis von Laktat mit Hilfe eines gekoppelten Enzym-Assays ist ein in der klinischen Chemie seit langem verwendetes und standardisiertes Verfahren (Noll, 1984). Die Veränderung der Laktatproduktion ist ein sensibler Marker für die Störung der Sertoli-Zellfunktion in vitro (Williams und Foster, 1988).

Die potentesten Noxen in Bezug auf die Schädigung des Reproduktionssystems führen zu den größten Veränderungen des Zellmetabolismus. Interessanterweise kommt es dabei ausschließlich zu einer Steigerung der Laktatproduktion, ein Phänomen, das auch bei Gossypol (Moss et al., 1988), 1,2-Dibromo-3-chloropropan (Miller et al., 1985) und weiteren Substanzen zu beobachten ist.

Inhibin als Referenz für die endokrine Funktion der Zellen kann erst seit einigen Jahren nachgewiesen werden (Moore et al., 1993). Inhibin-B hemmt über eine negative Rückkopplung mit der Hypophyse die Ausschüttung des Follikel-stimulierenden Hormons (FSH) (Anderson und Sharpe, 2000). Die Detektion dieses nur in minimalen Konzentrationen produzierten, aber für die Sertoli-Zelle hochspezifischen Hormons, erforderte früher die Verwendung eines Radioimmuno-Assays. Heute werden dagegen hochsensitive ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) eingesetzt. Neueste Untersuchungen zeigen, dass nur Inhibin-B beim Mann biologisch aktiv ist (De Kretser und McFarlane, 1996; Illingworth et al., 1996).

2 Aufgabenstellung

In dieser Arbeit soll der Einfluss von ausgewählten Umwelthormonen mit östrogener bzw. anti-androgener Wirkung sowie von Nitromoschusverbindungen auf wesentliche Funktionen (Vitalität, Laktat- und Inhibinproduktion) testikulärer Zellen im Rattenmodell untersucht werden. Eine mögliche Veränderung, der für die Spermatogenese essentiellen Sertoli-Zellfunktionen, kann zu einer Reifungsstörung der Samenzellen und damit zu einer Beeinträchtigung der männlichen Fertilität führen.

Hierzu werden etablierte biochemische Testmethoden eingesetzt, um über Konzentrations-Wirkungs-Kurven, quantitative Aussagen über die Toxizität des jeweiligen Schadstoffes zu machen. Als hormonell aktive Substanzen sollten das oral wirksame Östrogen Ethinylöstradiol, als Xenoöstrogen Bisphenol-A, als natürliches Östrogen 17 β -Östradiol sowie das Phytoöstrogen Daidzein untersucht werden. Moschus Keton ($C_{14}H_{18}N_2O_5$) und Moschus Xylol ($C_{12}H_{15}N_3O_6$) sind Nitromoschusverbindungen, welche häufig in der Kosmetikindustrie als Duftstoffe zur Anwendung kommen.

Die untersuchten Parameter sollten möglichst umfassend die Zellfunktionen repräsentieren und deren Modulation darstellen können.

In vitro Studien sind ein wichtiges Instrument, um zu prüfen, ob eine Substanz direkt schädigend auf eine Zielzelle wirkt oder ob es ein Metabolit dieser Substanz ist und eignen sich auch hervorragend für die Analyse des Schadmechanismus.

Die Auswahl der untersuchten Zellparameter sollte der komplexen Funktion und der Aufgabe der Sertoli-Zelle gerecht werden, ohne dabei praktische Gesichtspunkte wie Reproduzierbarkeit, Möglichkeit der Standardisierung, Untersuchung einer großen Anzahl von Proben und Wirtschaftlichkeit außer Acht zu lassen. Dies ist in vivo nicht oder nur eingeschränkt möglich. Bei reproduktionstoxikologischen Studien haben sich insbesondere Sertoli-Zellen in Primärkultur als ein nützliches in vitro System herausgestellt (Übersicht in Boekelheide, 1993). Einige sekretorische Parameter der Sertoli-Zelle, wie z.B. das Kohlenhydrat Laktat und das Proteinhormon Inhibin-B, zeigen oftmals signifikante Änderungen nach einer Exposition mit Noxen, die auch in vivo schädigend auf die männliche Fertilität bzw. die Spermatogenese wirken.

Anhand der gewonnenen Ergebnisse sollte es möglich sein, eine Aussage darüber zu treffen, ob die Sertoli-Zelle eine potentielle Zielzelle für die jeweils untersuchte Substanz darstellt. Das Fernziel stellt dabei die Etablierung eines effizienten reproduktionstoxikologischen in

vitro Screenings dar, um die Wirkung von hormonell aktiven Substanzen und von synthetischen Nitromoschusverbindungen auf das Reproduktionssystem zu beurteilen.

Die Wichtigkeit dieser Erkenntnisse begründet sich durch das Vorkommen der zu testenden Noxen in vielen chemischen Substanzen in unmittelbarer Umgebung des Menschen.

Deshalb kann diese Arbeit dazu dienen, eine mögliche Beeinflussung der Fertilität des Menschen durch diese Substanzen, aufzudecken.

3 Material und Methoden

Für die Zellkultur wurden Sertoli-Zellen von etwa 21 Tage alten Sprague-Dawley Ratten (Fa. Harlan Winkelmann, Borcheln) verwendet. Die Ratten wurden jeweils unmittelbar vor der Präparation geliefert. Die Versuche waren beim Regierungspräsidium Gießen unter dem Geschäftszeichen 17a-19c 20/15(c) gemäß § 8 Abs. 1 Tierschutzgesetz angezeigt worden. Alle Chemikalien wurden, soweit nicht explizit erwähnt, in der höchsten erhältlichen Qualität eingesetzt (pro analysi oder biochemisch rein). Für die Primärkultur der Sertoli-Zellen wurden speziell für die Zellkultur getestete Medien und Zusätze eingesetzt.

3.1. Verwendete Noxen

Östrogene:

Bisphenol A (Nr. I-0635, Sigma, Deisenhofen)

17- α Ethinylöstradiol (Nr. E-4876, Sigma)

Daidzein (Nr. D-7802, Sigma)

17- β Östradiol (Nr.E-2758, Sigma)

Ausgehend von einer Stammlösung wurden die Östrogene in Dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma, Steinheim) mit dem Zellkulturmedium auf die benötigte Konzentration (siehe 3.4.) eingestellt. DMSO hatte im Medium sowie in der Kontrolle eine Maximalkonzentration von 0,1%.

Nitromoschusduftstoffe:

Moschus Xylol: (Nr. NIT 129, Promochem, Wesel)

Moschus Keton: (Nr. NIT 130, Promochem, Wesel)

3.2 Verwendete Medien

1. Basismedium (Medium zum Herstellen der Kulturmedien unter Verwendung entsprechender Zusätze, Waschmedium):

Dullbecco's Modified Eagle's Medium:Ham's F-12 Medium (DMEM:Ham's F-12; 1:1, 31330-038, Gibco, Berlin)

2. Kulturmedium A

500 ml Basismedium mit folgenden Zusätzen (angegeben ist die jeweilige Endkonzentrationen im Basismedium):

- Cytosin Arabinosid (2 µg/ml; Sigma, C-1768)
- L-Glutamin (2mM; Gibco, 04305030-H)
- Penicillin-Streptomycin Lsg. (100 µg/ml; Sigma, P-3539)
- Epidermal Growth Factor (EGF; 10 ng/ml; Sigma, E-1257)
- Apo-Transferrin (5 µg/ml; Sigma, T-1147)
- Humaninsulin (2 µg/ml; Sigma, 1-1882)
- Hydrocortison (10^{-8} M; Sigma, H-0135)
- D-α-Tocopherol (Vitamin E; 200ng/ml; Serva, Heidelberg, 3656)
- All-trans-Retinol (Vitamin A; 200 ng/ml; Serva, Heidelberg, 38280)
- Testosteron (10^{-7} M; Sigma, T-5641)
- FSH (100 ng/ml; Sigma, F-4520)

3. Kulturmedium B

Entspricht Medium A ohne Zusatz von Cytosin-Arabinosid

4. Kulturmedium C

Entspricht Medium A ohne Cytosin-Arabinosid und ohne FSH

Bei der enzymatischen Isolation der Sertoli-Zellen wurden die nachfolgenden Medien verwendet:

1. Isolationsmedium A

20 ml Basismedium unter Zusatz von

- 20 mg Kollagenase (Sigma, C-0130) und
- 0,4 mg DNase (Sigma, DN-25)

2. Isolationsmedium B

20 ml Basismedium mit

- 40 mg Kollagenase
- 40 mg Hyaluronidase (Sigma, H-3506) und
- 0,4 mg DNase

3. Stopmedium

50 ml Basismedium mit

- 20 mg Trypsininhibitor aus Sojabohnen (Sigma, T-9003)
- 100 mg Rinderserumalbumin (Sigma, H-7825)

3.3. Präparation der Sertoli-Zellen

Bei der Präparation und im Umgang mit der Zellkultur wurde besonders auf die Verhinderung möglicher mikrobieller Kontamination geachtet. Dies bedeutet keimarmes Arbeiten unter der Sicherheitswerkbank (Klasse 2), Verwendung von sterilen Einmalartikeln bei Kunststoffröhrchen, Petrischalen, Pipettenspitzen, Pinzetten, Skalpellen, Handschuhen und Zellkulturschalen. Alle Kulturmedien und sonstige verwendete Lösungen wurden durch Sterilfiltration (Sterilfilterflaschen, Nalgene, New York, USA) sterilisiert. Die Sertoli-Zellkulturen wurden im Wesentlichen nach den Methoden von Hadley et al. (1985) und Onoda et al. (1990) angelegt, und dies ist im Folgenden beschrieben.

3.3.1. Rattenhodenpräparation

Die Tiere wurden in einen geschlossenen Kunststoffbehälter gesetzt, für ca. 10 min mit CO₂ begast und anschließend durch Eintauchen in 70% Ethanol äußerlich desinfiziert, um bei der Präparation mikrobielle Kontamination zu vermeiden. Danach wurde die Bauchhöhle eröffnet, die noch nicht deszendierten Hoden entnommen und in mit Gentamycin versetztem Basismedium (2ml Medium + 1ml Gentamycin, Sigma, G-3527) gewaschen. Schließlich wurde die Tunica albuginea der Hoden entfernt und der herausgeschabte Inhalt mit dem Skalpell zu einem feinen Brei zerkleinert.

3.3.2. Enzymatische Zellisolation

Kollagenase spaltet das Kollagen der Interzellularverbindungen, ohne die einzelnen Zellen allzu stark zu schädigen, während Hyaluronidase besonders kollagenreiche Zellverbände der Bindegewebszellen auftrennt. Die DNase hydrolysiert freigesetzte DNA, die sonst die Aggregation von Einzellzellen fördern würde. Der im Stopmedium enthaltene Trypsin-

Inhibitor und das Rinderserumalbumin stoppen die Aktivität des Enzyms Kollagenase. Dieser Vorgang der Isolierung der Zellen erfolgt durch die folgenden Arbeitsschritte.

1. Schritt

- Gabe des zerkleinerten Hodengewebes in ein 50 ml Zentrifugationsröhrchen (Falcon, Lincoln Park, New Jersey, USA) mit 20 ml Isolationsmedium A
- 15 min Schüttelwasserbad (37°C)
- Herausnehmen, 7 min bei Raumtemperatur sedimentieren lassen und Absaugen des Überstandes

2. Schritt

- Zugabe von 25 ml Stopmedium auf das Pellet
- Schütteln und 7 min stehen lassen
- Absaugen des Überstandes

3. Schritt

- Zugabe von 20 ml Isolationsmedium B zum Pellet
- Mischen und für 30 min ins Schüttelwasserbad stellen
- Zentrifugieren für 30 s bei 500 U/min (35xg)
- Absaugen des Überstandes

4. Schritt

- Zugabe von 25 ml Stoplösung zum Pellet
- Mischen und bei 500 U/min (35xg) 1 min zentrifugieren
- Absaugen des Überstandes

5. Schritt

- Zugabe von 20 ml Isolationsmedium B zum Pellet
- Mischen und für 15 min ins Schüttelwasserbad stellen
- 45 s bei 1000 U/min (130xg) zentrifugieren
- Absaugen des Überstandes

6. Schritt

- Zugabe von 30 ml Kulturmedium A
- Mischen
- Gabe der gesamten Menge in einen Homogenisator (sog. „Potter“, ein Glaszylinder mit einem teflonüberzogenen Edelstahlstab) zum Aufbrechen von Zellklustern
- Homogenisieren durch 10maliges Auf- und Abbewegen des „Potters“

7. Schritt

- Filtrieren der Zellsuspension durch ein 70 µm Nylon Sieb (Falcon, BD Bioscience, Heidelberg)

Die letzten beiden Schritte dienten der nochmaligen mechanischen Trennung der Zellen und der Gewinnung möglichst vieler Einzelzellen.

3.3.3. Anlegen der Zellkultur

Die Zellzahl wurde in einer handelsüblichen Zählkammer nach Neubauer bestimmt und durch Zugabe einer entsprechenden Menge Kulturmedium A auf eine Dichte von 10^6 Zellen pro ml Suspension eingestellt. Anschließend wurden die Zellen auf 24er Kulturplatten (Primaria, Falcon) mit je 1 ml Suspension pro Vertiefung (Well) ausplattiert (entsprechend 10^6 Zellen/Well bzw. 0.5×10^6 Zellen/cm²). Das in Kulturmedium A enthaltene Mitosegift Cytosin-Arabinosid hemmt die Proliferation und unterdrückt damit das Wachstum von kontaminierenden Zellpopulationen (hauptsächlich Peritubular-Zellen).

Die Reinheit der Zellkultur wurde regelmäßig morphologisch und histochemisch überprüft (s.a. Kapitel 3.3.5.). Dazu wurde ein Teil der Zellsuspension in geringer Dichte (400.000 Zellen/ml) in separate 24er Kulturplatten gegeben und auch in diesen Platten histochemisch analysiert.

3.3.4. Behandlung der Zellen mit hypotoner Lösung

Nach 48 Stunden wurden die Zellen mit einer hypotonen Lösung (20 mM Tris-HCl, pH 7,5) behandelt. Die Osmolarität dieses Tris-Puffers beträgt nur 90 mOsmol/kg gegenüber 300 mOsmol/kg des normalen Zellkulturmediums. Dieser sogenannte „hypotone Schock“ lässt die Sertoli-Zellen relativ unbeeinflusst, führt jedoch zum Absterben der in der Kultur vorhandenen Keimzellen (Spermatogonien und Spermatozyten; Galdieri et al., 1981).

Die Behandlung der Zellen wurde folgendermaßen durchgeführt:

- Auflösen von 240 mg Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethan; Sigma 6791) in Aq. dest zur Herstellung einer 20mM Tris-Lösung
- Titrieren der 20 mM Tris-Lösung auf den pH Wert von 7,5 mit HCl
- Sterilfiltration
- Erwärmen auf 34°C im Schüttelwasserbad
- Absaugen des Mediums von den Zellkulturschalen und Zugabe von 1ml 20mM Tris-HCl pro Well
- Inkubation für 5 min
- Absaugen der Lösung
- Waschen der Zellen mit 1 ml Basismedium pro Well
- Zufügen von je 1 ml Kulturmedium B (ohne Cytosin Arabinosid)

Die Zellen wurden anschließend wieder in den Brutschrank gegeben.

3.3.5. Überprüfung der Reinheit der Zellkultur

Zur Überprüfung der Reinheit der Zellkultur wurden die mit geringer Dichte auf 24-Well Kulturplatten ausplattierten Sertoli-Zellen verwendet. An Tag 1-6 erfolgten mit diesen Zellen Behandlungen wie Mediumwechsel, Aufbewahrung im Brutschrank und hypotoner Schock nach 48 Std.. Am sechsten Tag wurde die Kultur dann durch spezifische Färbung und Mikroskopie auf das Vorhandensein von fremden Zellpopulationen untersucht.

Leydig-Zellen wurden durch Färbung auf 3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase (Welsh und Wiebe, 1975) nachgewiesen. Das Färbemedium setzte sich folgendermaßen zusammen:

- 2 ml PBS (Phosphate Buffered Saline, 10 mM Na₂HPO₄/KH₂PO₄, 136 mM NaCl, 2,6 mM KCl, 1,42 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, pH 7,3; Oxoid, Ltd, Basingstoke, Hampshire, UK)
- 0,25 ml Nitro-Blue Tetrazolium (NBT; 0,25 mg/0,25 ml Aq. Dest; Sigma, N-6876)
- 0,5 ml NAD (2,5 mg/0,5 ml Aq. dest.; Sigma, H-7825)
- 0,25 ml Etiocholan-3 β -ol-17-one (0,4 mg/ml Propyleneglycol-ethanol, 1:1; Sigma, E-5251)
- Einstellen des pH Wertes auf 7,7 mit ca. 200 μ l 0,1 M Na₂HPO₄

Das Kontrollfärbemedium enthielt Aq. dest. anstelle von NBT. Die mit Zellsuspension versehenen Wells wurden bei Raumtemperatur für 40 min in einer feuchten Kammer angefärbt und anschließend mit PBS gewaschen.

Peritubuläre Myoidzellen wurden durch diese Färbung auf alkalische Phosphatase (Anthony et al., 1987), die im Wesentlichen auf diesen Zellen lokalisiert ist, dargestellt.

Das Färbemedium wurde folgendermaßen angesetzt:

- 10 mg Naphtol AS-2-Phosphorsäure (Sigma, N 2250) werden in 40 µl DMSO (Serva) gelöst und mit 5 ml Aq. dest. verdünnt
- Zugabe von 5 ml 2-Amino-2-methyl-1-propanol (AMP)-Puffer: 25 mM AMP (1,11 g /500 ml Aq. dest.; Sigma) mit 1,25 mM MgCl₂ (0,127 g/500ml), pH 8,9 (mit 37% HCl einstellen)
- Kurz vor der Inkubation werden 10 mg Fast Red Violet LB (Sigma, F-3381) hinzugefügt und das gesamte Medium durch einen 0,2 µm Spritzenfilter (Sigma) gegeben.

Vor der Färbung wurden die Zellen bei Raumtemperatur für 10 min mit einer Lösung aus 4% (V/V) Formaldehyd in 100mM Phosphatpuffer fixiert. Zur Färbung wurden 600µl Reagenzlösung pro Well appliziert und dann für 30 min in die Feuchtkammer gegeben. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Bei der Mehrzahl der Präparationen war der Anteil der Zellen, welche sich anfärbten, ≤ 5%.

Sertoli-Zellen wurden durch Anfärben des intermediären Filamentproteins Vimentin nachgewiesen (Wrobel et al., 1995). Vimentin kommt in allen somatischen Zellen vor, d.h. im Testis werden neben Sertoli-Zellen auch Peritubular- und Leydig-Zellen angefärbt. In isoliertem Keimepithel allerdings wird Vimentin nur von Sertoli-Zellen exprimiert. Keimzellen zeigen dagegen keine immunhistochemische Anfärbung. Dazu waren folgende Schritte notwendig:

1.Tag:

- Nach Absaugen des Mediums, Spülen mit PBS (pH 7,5)
- Inkubation in 3%igem H₂O₂ für 5 min bei Raumtemperatur
- 3-maliges Waschen mit PBS für 5 min
- Präinkubation der Kulturschalen für 60 min bei Raumtemperatur in normalem Kaninchenserum (Dako, X-902) 1:5 in PBS verdünnt plus 5% BSA.
- Inkubation der Zellen über Nacht mit dem 1.Antikörper: 1:1000 Monoklonaler Anti-Vimentin Antikörper von Mäusen (Sigma, V-6630) in PBS plus 1% BSA bei 4°C.

2. Tag

- 3-maliges Waschen in PBS je 5 min

- Inkubation der Zellen für 60 min bei Raumtemperatur mit dem 2. Antikörper: Peroxidase-konjugierter Kaninchen-Anti-Maus-IgG (Dako, P-260) 1:100 mit PBS plus 1% BSA
- 3-maliges Waschen in PBS, 5 min
- Einmaliges Waschen in Tris-HCl (pH 7,3) für 5 min
- Inkubation in DAB (Sigma, D-5905), 1 Tbl. in 15ml Tris-HCl plus 1% NiCl₂

3.4. Toxikologische Untersuchung der zu testenden Substanzen

Am 6. Tag wurde das Medium abgesaugt und durch 500 µl Kulturmedium C pro Well, in dem verschiedene Konzentrationen der jeweiligen zu testenden Substanz enthalten waren, ersetzt. Die Nitromoschusverbindungen Moschus Keton und Moschus Xylol sowie 17- α -Ethinylöstradiol, 17 β -Östradiol und 4,4-Isopropylidendiphenol (Bisphenol-A) wurden für jede Versuchsreihe frisch gewogen und in 1ml Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. Daraus wurden jeweils 5 Lösungen zu je 0,1/1/10/100/1000 ng/ml Kulturmedium C oder 1/10/100/1000/10000 ng/ml Kulturmedium C hergestellt.

Die Kontrollreihen der 24-Well-Kulturplatten wurden nur mit Kulturmedium C + DMSO behandelt (In 1ml Kulturmedium C wurde 1µl DMSO gelöst). Die Kulturplatten mit 24 Wells wurden folgendermaßen behandelt:

- Absaugen des Mediums
- Well 1 – 4 (Kontrollen): 500 µl Kulturmedium C + dem darin gelösten DMSO (1µl DMSO/1ml Kulturmedium C)
- Well 5 –24: 500 µl Kulturmedium C + die jeweils zu testende Substanz (vorher gelöst in 1 ml DMSO) in 5 unterschiedlichen Konzentrationen (4 Wells/Konzentration)

Sertoli-Zellen wurden danach im Brutschrank bei 34°C inkubiert. Nach 24 h, 48 h und 72h wurden Proben der Kulturplatten, für die Laktat (500µl/Well) oder für die Inhibinbestimmung (250µl/Well), entnommen (weiteres Vorgehen siehe Laktat- und Inhibinbestimmung). Es erfolgte die vorsichtige Absaugung des restlichen Mediums (bei Inhibinbestimmung) und die Bestimmung des Proteingehaltes der Sertoli-Zellen (siehe Proteinbestimmung).

Für die MTT-Messung wurden 96-Well-Kulturplatten verwendet, dabei ohne vorherige Probenentnahme, das gesamte Medium abgesaugt, und die Zellen entsprechend weiterbehandelt (siehe MTT-Messung).

3.4.1. MTT-Messung

Die Vitalität der Zellen wurde mit dem MTT-Assay bestimmt. MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium Bromid), ein gelber wasserlöslicher Farbstoff, wird durch mitochondriale Dehydrogenasen zu einem blauen wasserunlöslichem Formazan-Produkt reduziert. Diese Umwandlung vollzieht sich ausschließlich in lebenden Zellen. Die Konzentration des reduzierten blauen Farbstoffes wird photometrisch gemessen. Die Ausbeute an blauem Farbstoff ist ein direktes Maß für die Vitalität der untersuchten Zellpopulation. Sie ist direkt proportional zur Zellzahl und zur Zahl der Mitochondrien und nimmt in nichtvitalen Zellen/Zellverbänden rapide ab. Da die Zahl der Mitochondrien in der Sertoli-Zellkultur relativ stabil bleibt (Kelly et al., 1991), reflektiert eine Veränderung der Farbstoffmenge eine Veränderung der Zellzahl, der Zellvitalität oder beider Parameter. Für diese Bestimmung wurden die Zellen für 24 Std. bei 34°C mit verschiedenen Konzentrationen der zu untersuchenden Substanzen inkubiert und folgendermaßen weiterbehandelt.

1. Absaugen des Mediums und Zugabe von je 200 µl PBS (pH 7,3) und 20 µl MTT Lösung (Serva, 5 mg/ml in PBS gelöst); Verwendung von 96-Well Mikrotiterplatten
2. Inkubation für 1 Std. bei 34°C
3. Absaugen des Überstandes und Auflösen des reduzierten MTT mit je 200µl/Well Dimethylsulfoxid (DMSO).
4. Entnahme von je 80µl Probe und Messung der Absorption in Doppelbestimmung bei 550 nm unter Subtraktion der Hintergrundabsorption bei 620 nm in Mikrotiterplatten im MTP Reader EAR 400 ATC (SLT Labinstrumente, Wien, Österreich).

Je höher der gemessene Extinktionswert, desto größer die Konzentration des Farbstoffes und damit der Anteil an vitalen Zellen in der untersuchten Probe.

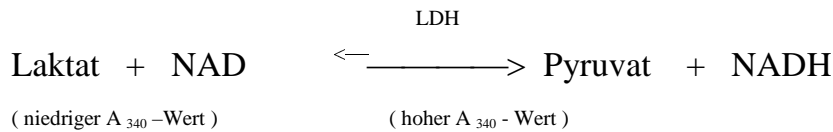
Die Ergebnisse wurden als prozentualer Anteil vitaler Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe unbehandelter Zellen dargestellt:

$$\% \text{ Vitalität} = \frac{\text{Extinktion (Test)}}{\text{Extinktion (Kontrolle)}} \times 100$$

3.4.2. Laktatbestimmung

Seit der Verfügbarkeit von hochgereinigtem Nikotinsäureamidadenindinukleotid (NAD) und Laktatdehydrogenase (LDH) konnte ein hochspezifischer Test für Laktat entwickelt werden. Die katalytischen Charakteristika von LDH ermöglichen eine spektralphotometrische Messung von Laktat bei einer Wellenlänge von 340 nm anhand des nachstehend beschriebenen Testverfahrens der NADH (reduziertes Nikotinsäureamidadenindinukleotid)-Produktion (Noll et al., 1984).

Grundlagen des Verfahrens:



Um den Verlauf der Reaktion in der gewünschten Richtung zu erzielen, muss das gebildete Pyruvat durch Hydrazin gebunden werden, wodurch es aus der Reaktionsgleichung entfernt wird. Die erhöhte Extinktion bei 340 nm aufgrund der Bildung von NADH gibt Aufschluss über die ursprünglich vorhandene Laktat-Konzentration. Die große Anzahl von Proben bei dieser Arbeit machte es notwendig, die in der Literatur beschriebene Methode wie folgt zu modifizieren:

Nach 48-stündiger Inkubation (synthetische Nitromoschusduftstoffe) und 72-stündiger Inkubation (Bisphenol-A, Daidzein, 17β-Östradiol, 17α-Ethinylöstradiol) mit frischem bzw. schadstoffhaltigem Medium wurden je 250µl des Zellüberstandes entnommen, für 5 min auf 95°C erhitzt, zentrifugiert und bei -18°C tiefgefroren. Die Proben wurden dann innerhalb einer Woche weiterverarbeitet. Für die Laktatbestimmung wurden folgende Lösungen benötigt :

Reagenzien:

Laktat-Kit (Sigma Diagnostics)

Laktatdehydrogenase (Nr. 826-6):

LDH (aus Rinderherz)-Suspension in Ammoniumsulfat.

LDH-Aktivität bei der Herstellung ca. 1000 U/ml

Glycinpuffer (Sigma-Aldrich, Nr.826-3):

Glycin (0,6 mol/l) und Hydrazin; pH-Wert 9,2 bei 25° C.

NAD (Sigma-Aldrich, Nr. 260-110):

Nikotinamidadenindinukleotid. Grad 3. 10 mg in vorgewogenen Röhrchen.

Laktatstandardlösung (Sigma-Aldrich, Nr. 826-10):

L(+)-Milchsäure. 40 mg/dl (4,44 mmol/l). Enthält 0,1% Natriumazid als Konservierungsmittel.

Verfahren:

- Die benötigte Anzahl der NAD-Röhrchen (Sigma-Aldrich, Nr.260-110) wurden durch Einbringen der folgenden Flüssigkeitsmengen vorbereitet:
2,0 ml Glycinpuffer,
4,0 ml Aqua dest.
0,1 ml Laktatdehydrogenase (LDH)
Anschließend wurden alle Röhrchen verschlossen und NAD durch mehrmaliges Umkehren der Röhrchen aufgelöst. Die Lösung ist bei Zimmertemperatur 4 Stunden lang stabil, bei gekühlter Lagerung (2 – 8° C) 24 Stunden lang.
- 0,9 ml dieser Lösung wurden in jeweils eine 1ml-Kunststoffküvette gefüllt
- Den Küvetten wurden 0,1 ml des Zellüberstandes unterschiedlicher Konzentrationen (8 Küvetten / Konzentration = 4 Doppelbestimmungen / Konzentration bei 24-Well-Platten) zugefügt. Danach erfolgte sorgfältiges Mischen.
- Als Blank (A_2) wurde 0,1 ml H_2O zugegeben, anstelle des Zellkulturüberstandes
- Küvetten wurden nun 15 Minuten bei 37° C inkubiert.
- Bestimmung der Extinktionen (jeweils Doppelbestimmungen einer Messprobe) bei 340 nm am Spektralphotometer DU 68 (Beckmann, München).

Bei jeder Bestimmung wurde der Laktatgehalt zweier Lösungen mit standardisierter Konzentration (siehe Laktatstandardlösung) mitbestimmt. Die Messung verlief linear im Konzentrationsbereich von 2 bis 20 mg Laktat/100 ml (= 20-200 μ g/ml).

Die endgültige Laktatkonzentration wurde mittels folgender Formel ermittelt:

$$\text{Laktat (mmol/l)} = \Delta A_{340} * 1,0/6,22 * 0,1 * 1 = \Delta A_{340} * \mathbf{1/0,622}$$

- ΔA_{340} = endgültige maximale Extinktion bei 340 nm ($A_1 - A_2$)
- 1,0 = Reaktionsvolumen (ml)
- 6,22 = millimolares Absorptionsvermögen von NADH bei 340 nm
- 0,1 = Volumen (ml) der jeweiligen Probe in der Küvette
- 1 = Messweg in cm. (beträgt der Messweg nicht 1 cm, so ist dieser Wert (in cm) in der obigen Gleichung entsprechend anzupassen).

Umrechnung der Laktatwerte in mg/Well:

- $1/0,622 * 90/2000$
 $1/0,622$ = oben definierter Faktor
 90 = Molekulargewicht der Milchsäure
 2000 = Umrechnung der Ergebnisse von l in 500 μ l (Menge des Kulturmedium C + die jeweils zu testende Substanz od. DMSO für 24-Well-Platten)
- Um eine größere Anzahl an Proben zu gewinnen, wurden bei der Laktatbestimmung teilweise 96-Well-Kulturplatten verwendet.

Faktoren für die Umrechnungen der Ergebnisse : Laktat in mg/Well

- 24 - Well - Platte: $1/0,622 * 90/2000$
- 96 - Well - Platte: $1/0,622 * 90/4000$

3.4.3. Inhibinbestimmung

Die Bestimmung der Inhibinkonzentration im Medium erfolgte mit dem Inhibin-B Immunassay-Kit (Serotek, Oxford, UK) und wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt (Groome et al., 1996). Der hier verwendete ELISA weist die β -Kette des Inhibin selektiv und äußerst sensitiv nach.

Prinzip des Inhibin-B Assay's (ELISA):

Mikrotiterplatten, welche Antikörper gegen die β -Untereinheit des Inhibins enthielten, wurden mit Standardlösungen, Kontrolllösungen und fötalem Kälberserum gefüllt. In der darauffolgenden Inkubationszeit band das Antigen (Inhibin-B) durch seine β -Untereinheit an den immobilisierten Antikörper auf den Mikrotiterplatten. Nach zwei Waschvorgängen wurde ein weiterer Antikörper hinzugegeben. Dieser war gegen die α -Untereinheit des Inhibins gerichtet und mit einer alkalischen Phosphatase markiert. Ein weiterer Waschvorgang entfernte Material, welches nicht gebunden hatte. Durch Zugabe eines speziellen Substrates für das Enzym alkalische Phosphatase ist die Reaktion durch eine Rotfärbung in verschiedenen Farbtiefen sichtbar geworden. Die Farbergebnisse aus den Reaktionen der Kontrolllösungen waren direkt proportional zu den Farbergebnissen der Standardlösungen (enthielten Inhibin B Standard).

Reagenzien:**Inhibin B Kit (Serotec)**

- 2 Inhibin B-Mikrotiterplatten (MCA1312K)
- 6 ml 6% (SDS) Sodium Dodecyl-Sulfat-Solution (SDS1312)
- 2x5 ml fötales Kälberserum (CO1312)
- Inhibin B Standard (2000 pg/ml) (HPS1312)
- 40 ml Lösungsmittel (BUF1312)
- 2x0,1 ml Inhibin B Antikörper (MCA1312A)
- 100 ml Waschpuffer (25 x konzentriert) (WB1312)
- 1 x Substrat + Lösung (13 ml) (SB011) (DS011)
- 1 x Amplifier + Lösung (13 ml) (AMP011) (DA011)
- 13 ml Stop-Lösung (STPO011)
- Wasserstoffperoxid (30%)

Durchführung des Verfahrens:

- Vorbereitung der Probelösungen in Eppendorf-Röhrchen (4 Stck/ Konzentration der jeweils zu testenden Substanz (a = 100 µl).
- Vorbereitung der Standardlösungen:
 - Verdünnung des fötalen Kälberserums mit 5 ml destiliertem Wasser (10 minütiges Auflösen durch Schütteln)
 - 1,3 ml des Kälberserums wurden zum Inhibin-B Standard gegeben und vermischt (2000 pg/ml)
 - Herstellung der Standardreihe von Inhibin B (1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25 und 15,6 pg /ml) durch Verdünnung mit Kälberserum
 - von jeder der 7 Standardlösungen wurden 100 µl abgenommen und in Eppendorf-Röhrchen gefüllt
- je 100 µl Kälberserum wurden in 2 Eppendorf -Röhrchen gegeben (Blank)
- Behandlung der Standardlösungen, Kälberseren und Proben jeweils mit 50 µl 6% SDS
- Erhitzen bei 96° C für 5 min
- Abkühlen
- 100 µl Lösungsmittel in jedes Eppendorf-Röhrchen geben
- danach Zugabe von je 50 µl Wasserstoffperoxid (6%, Verdünnung aus 30%), Inkubation bei Raumtemperatur für 30 Minuten

- Umfüllung in Mikrotiterplatten (je Mikrotiterplatte 14x80 µl Standardlösungen, 4x80 µl Kälberserum, Proben mit je 80 µl); es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt
- Inkubation über Nacht in einer feuchten Kammer
- am folgenden Tag wurde zu je 0,1 ml Inhibin-B Antikörper 1ml Lösungsmittel gegeben; Umfüllung in zwei 15 ml Röhrchen und Auffüllung mit 5 ml Lösungsmittel
- Mikrotiterplatten 4 x waschen und anschließend über Kopf auf Filterpapier trocken klopfen
- Pro Well wurden dann 50 µl des verdünnten Inhibin-B Antikörpers eingefüllt
- Inkubation der Mikrotiterplatten 3 h bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer
- 8x Waschen der Mikrotiterplatten, beim letzten Waschgang wird der Waschpuffer nicht entfernt, sondern 15 min in den Wells belassen
- Substratlösung (13 ml), 5 min mischen
- 3x Waschen der Mikrotiterplatten
- Zugabe des gelösten Substrates (pro Well = 50 µl)
- 1 Stunde Inkubationszeit in feuchter Kammer
- Verstärkerlösung (13 ml), 5 min Mischen
- Zugabe des gelösten Verstärkers (pro Well = 50 µl)
- Messung der Absorption in Doppelbestimmung bei 420 nm unter Subtraktion der Hintergrundabsorption bei 620 nm in Mikrotiterplatten im MTP Reader EAR 400 ATC (SLT Labinstruments).

Umrechnung der Ergebnisse:

- Inhibin (IHB) wurde in pg/ml am Photometer gemessen
- $\text{Inhibin/Well (pg/ 0,5 ml)} = \text{IHB (pg/ml)} / 2$
- $\text{Protein (mg/Well)} = \text{Protein (mg/Well)} / 5$ (siehe Proteinbestimmung)
- $\text{IHB (pg/100 µg Protein)} = 100 \text{ µg Protein} \times \text{IHB (pg/Well)} / \text{Protein (mg/Well)}$

Aus den Werten der Standards wurde eine Eichkurve bestimmt, aus der die Inhibinkonzentration der einzelnen Proben ermittelt werden konnte. Die Sensitivität dieses Assays betrug 1 pg Inhibin/Probe bzw. 0,2 pg Inhibin/100µg Protein/24Std.

3.4.4. Proteinbestimmung

Der Proteingehalt der Zellen wurde als Bezugswert für die Parameter Laktat und Inhibin verwendet. Die Proteinbestimmung erfolgte mit dem BIO-Rad Protein Assay (Bio Rad; 500-0116, Hercules, CA, USA), basierend auf der Methode von Lowry et al. (1951).

Dazu wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen mit jeweils 200 μ l 1 M NaOH unter Zusatz von 0,1% SDS pro Well versetzt. Nach 2 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur wurde jeweils eine Probe von 20 μ l für die Messung in Doppelbestimmung auf Mikrotiterplatten verwendet. Zu diesem Zeitpunkt waren mikroskopisch keine Zellbestandteile mehr nachweisbar. Die Messung verlief wie folgt:

1. Zugabe von 200 μ l Reagenz A zu je 20 μ l Probe. Dabei bindet der Farbstoff unspezifisch an die Aminogruppen der in der Probe enthaltenen Proteine.
2. Zugabe von je 25 μ l Reagenz B und damit Auslösen einer Farbreaktion, die umso stärker ausfällt, je mehr Protein vorhanden ist.
3. Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur
4. Messung der Absorption der Lösung am MTP-Reader EAR 400 ATC (SLT-Labinstruments) bei $\lambda=690$ nm und Bestimmung des Proteingehaltes mittels Standardkurve.

Die Standardkurve wurde mit in NaOH+SDS (s.o.) gelöstem Rinderserumalbumin (BSA, H-9568 Sigma) in den Konzentrationen 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25 und 15,6 pg/ml ermittelt und verlief im Bereich von 200-1400 pg/ml linear. Die untere Nachweisgrenze lag bei 200 pg/ml. Die gemessenen Proteinmengen lagen zwischen 50 und 80 μ g Zellprotein pro Well bzw. pro 10^6 Zellen.

3.5. Optimierungen

Beim Anlegen der Zellkulturen und der Durchführung der verschiedenen Assays traten immer wieder Probleme auf, die teils umfangreiche Vorversuche bzw. Veränderungen, der in der Literatur beschriebenen Methoden, notwendig machten.

Beim Ausplattieren fiel auf, dass die Sertoli-Zellen möglicherweise aufgrund ihrer Oberflächeneigenschaften zu Klusterbildung neigen. Dies hatte zur Folge, dass beim Auszählen einzelner Proben einer Präparation (s. Kpt. 3.3.3.) die Zelldichte stark variierte.

Die gewonnenen Daten wurden zwar auf die jeweilige Proteinmenge bezogen, dennoch ist davon auszugehen, dass sich das Verhalten der Zellen in Abhängigkeit von der Struktur und Größe des Zellverbandes verändert. Die Klusterbildung führte zudem zu einer mikroskopisch sichtbaren inhomogenen Verteilung der Zellen auf den einzelnen Vertiefungen der Zellkulturschale. Dies hatte weiterhin zur Folge, dass die gemessenen Werte (Protein, Laktat, Inhibin) stark variierten, was die Erstellung verschiedener Standardkurven notwendig machte, bzw. dass die Proben entsprechend verdünnt werden mussten. Im ungünstigsten Fall lagen die Werte außerhalb der Nachweisgrenze. Um dieses Problem zu beheben, wurden sterile Einmal-Siebe der Firma Falcon mit einer Maschenweite von 70 µm verwendet.

Als Referenzgröße für die Stoffwechselfparameter wurde der Proteingehalt der Zellen bestimmt. Zur Anwendung kam das Verfahren nach Lowry et al. (1951). Zur Trennung der Zellen wurde Natronlauge verwendet. Da sich einige Zellen sehr schlecht in der verwendeten Natronlauge voneinander lösten, wurde das Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) zugesetzt. Bei der Vitalitätsbestimmung mittels MTT-Assay wird in der Originalvorschrift das Voneinanderlösen der Zellen und das Lösen des Formazanproduktes in salzsaurem Isopropanol empfohlen. Nach einigen Versuchen zeigte sich, dass schon nach kurzer Zeit durch Verdunstung Fehler in der photometrischen Bestimmung des Proteingehaltes auftraten. Daher wurde letztlich DMSO als Lösungsmittel verwendet. Aufgrund des wesentlich höheren Siedepunktes sind hier Fehler durch Verdunstung des Lösungsmittels zu vernachlässigen.

Zur Laktatmessung wurde ein handelsüblicher Kit (Sigma Diagnostics) verwendet. Die Messung wurde in 1 ml Kunststoffküvetten durchgeführt. Für eine 24-Well-Zellkulturplatte waren dabei etwa 52 Einzelmessungen (Doppelbestimmung+Standards) nötig. Die Vorbehandlung des Überstandes mit Perchlorsäure zum Ausfällen von Proteinen erwies sich als unnötig. Durch Erhitzen der Proben auf 95°C, anschließendes Zentrifugieren sowie Lagerung bei -18°C, konnten relevante Enzyme inaktiviert werden.

Bei der Durchführung des Inhibin-Assays fiel auf, dass die Konzentration des Hormons bei vielen Proben so gering war, dass es nicht mehr detektiert werden konnte. Die Ursache sahen wir zum einen in der unterschiedlichen Herkunft und Lebenshaltung der Versuchstiere (s. Kpt. 5) und zum anderen in der Lagerung der Proben vor der Durchführung des Assays. Die Proben wurden daher unmittelbar nach Versuchsende bzw. innerhalb einer Woche nach Gewinnung weiterverarbeitet.

Für die eigentlichen Experimente wurde das Endvolumen pro Well auf 500 µl verringert, wodurch sich die Konzentration des Inhibins deutlich erhöht. Beide Maßnahmen führten zu einer optimierten Bestimmung der Inhibin-Werte. Das Vorlösen in DMSO war dank deren guter Wasserlöslichkeit unproblematisch.

3.6. Statistik

Die Experimente zur Laktat-, MTT- und Inhibin-Messung wurden mindestens dreimal wiederholt. Dabei ergaben sich vergleichbare Ergebnisse. Die dargestellten Resultate entsprachen jeweils einem repräsentativen Experiment; durchgeführt an je zwei Kulturplatten mit insgesamt acht Wells pro untersuchter Schadstoffkonzentration. Für die MTT-Messung wurden 96-Well-Kulturplatten verwendet mit insgesamt 10 Wells pro untersuchter Schadstoffkonzentration. Die Experimente zur Untersuchung der Inhibinsekretion unter Einwirkung von Nitromoschusverbindungen wurden an Kulturplatten mit vier Wells pro Konzentration durchgeführt. Die Normalverteilung der Proben wurde vorher getestet (Chi²-Test, Microsoft Excel). Wenn keine Normalverteilung vorlag wurde der Mann-Whitney-Test angewandt (Graph PAD In Stat. Dr. Saunders, Graph PAD Software vers. 1.11a, 1990, San Diego, Californien, USA). Die einzelnen Messreihen wurden durch Experimente an unterschiedlichen Präparationen der primären Sertoli-Zellen durchgeführt. Teilweise lagen daher variierende Ergebnisse der Kontrollen vor, z.B. schwankt der Laktatwert zwischen 20 und 60 µg/100 mg Protein. Die jeweiligen Messwerte konnten daher nicht zusammengelegt werden, um eine größere Stichprobe zu erhalten.

Die Werte in den Diagrammen des Ergebnisteils (Kpt. 4) entsprechen dem Mittelwert \pm der Standardabweichung. Die Symbole (xxx), (xx) und (x) kennzeichnen dabei ein Signifikanzniveau von ($p < 0,001$), ($p < 0,01$) bzw. ($p < 0,05$) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die Anzahl der Messwerte (n) ist jeweils angegeben. Die EC₅₀-Werte wurden durch graphische Extrapolation aus den entsprechenden Dosis-Wirkungs-Diagrammen ermittelt. Der EC₅₀-Wert entspricht derjenigen Schadstoffkonzentration, bei der eine Abnahme der Messgröße auf 50% des Kontrollwertes (unbehandelte Probe) beobachtet wurde.

4. Ergebnisse

4.1. Darstellung der primären Sertoli-Zellkultur nach Präparation, vor und nach Behandlung mit hypotoner Lösung

Abbildung 3 zeigt die primäre Sertoli-Zellkultur vor und nach dem sogenannten „hypotonen Schock“ (siehe 3.3.4.). In Abb. 3A ist die Keimzellkontamination noch deutlich zu erkennen, während in Abb. 3B vermehrt Spermatogonien und Spermatozyten abgestorben sind.

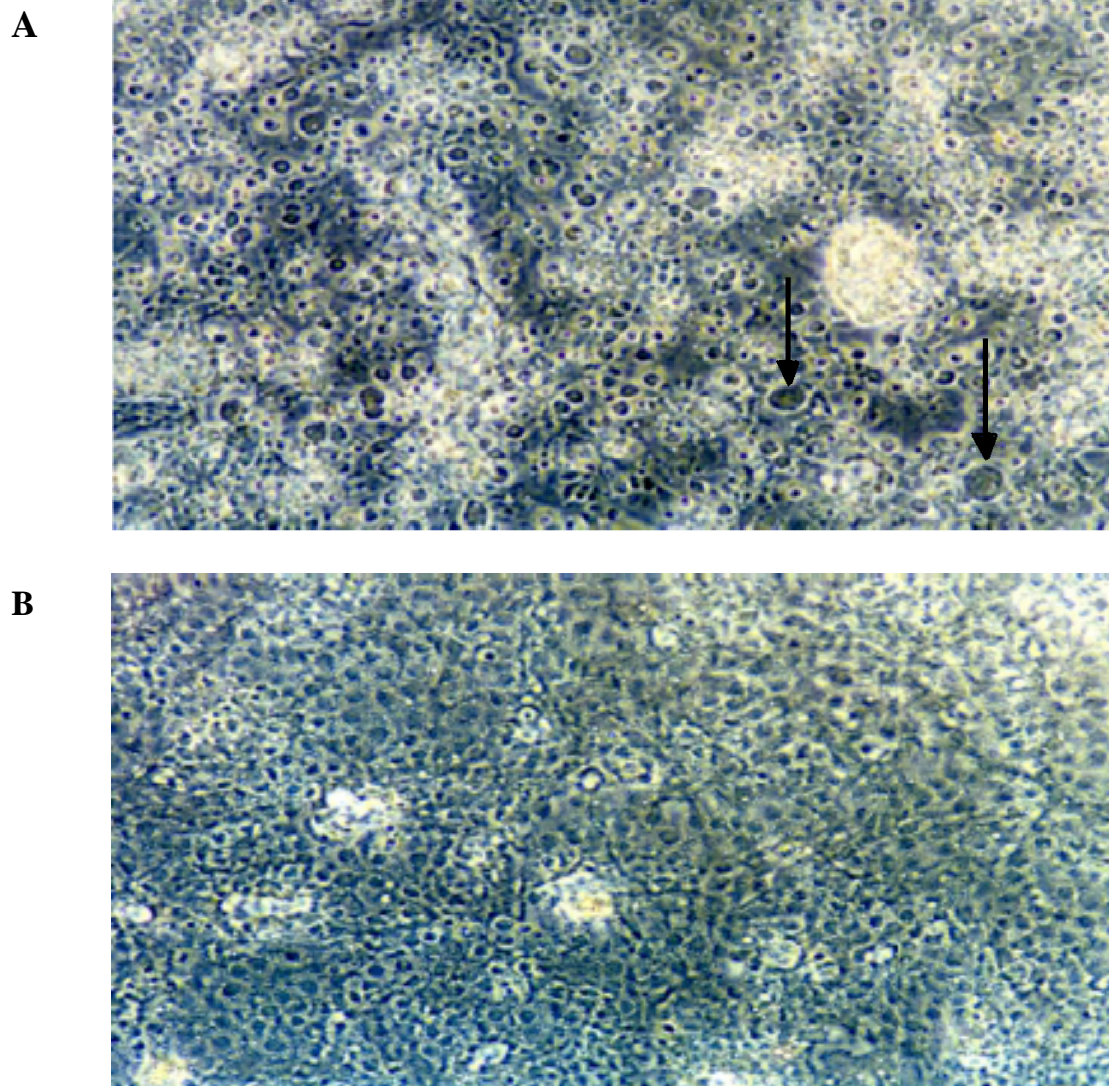


Abb. 3: Primäre Sertoli-Zellkultur am zweiten Tag nach Präparation, vor (A) und nach (B) Behandlung mit hypotoner Lösung (Vergrößerung 310 fach).

4.2. Darstellung angefärbter peritubulärer Myoidzellen und Sertoli-Zellen

Peritubuläre Myoidzellen wurden durch Färbung auf alkalische Phosphatase (Anthony et al., 1987), die im wesentlichen auf diesen Zellen lokalisiert ist, dargestellt (Abb. 4).

Der Sertoli-Zellrasen zeigt keine Anfärbung auf alkalische Phosphatase. Nur sehr wenige Zellen (< 5%) waren positiv für dieses Enzym, so dass es sich dabei um eine geringfügige Kontamination mit peritubulären Zellen handelt.

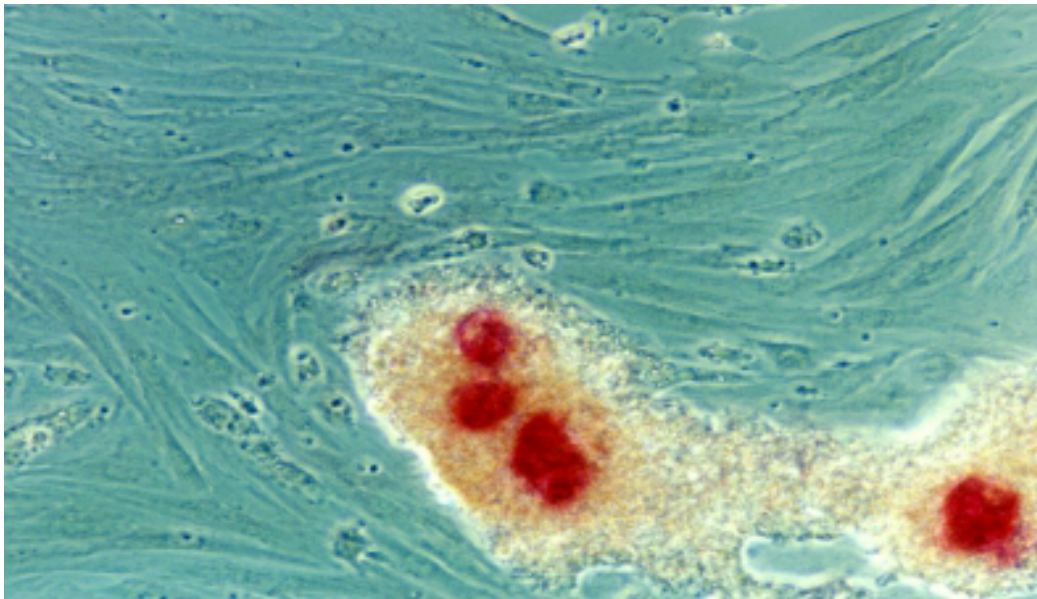


Abb. 4: AP-Färbung zur Darstellung von peritubulären Myoidzellen (Vergrößerung 190fach).

Durch Anfärbung des intermediären Filamentproteins Vimentin wurden Sertoli-Zellen in Abbildung 5 dargestellt (siehe 3.3.5.). Der Sertoli-Zellrasen weist eine einheitliche positive Färbung für Vimentin auf. Es sind nur ganz vereinzelt (1-2%) Keimzellen zu detectieren.

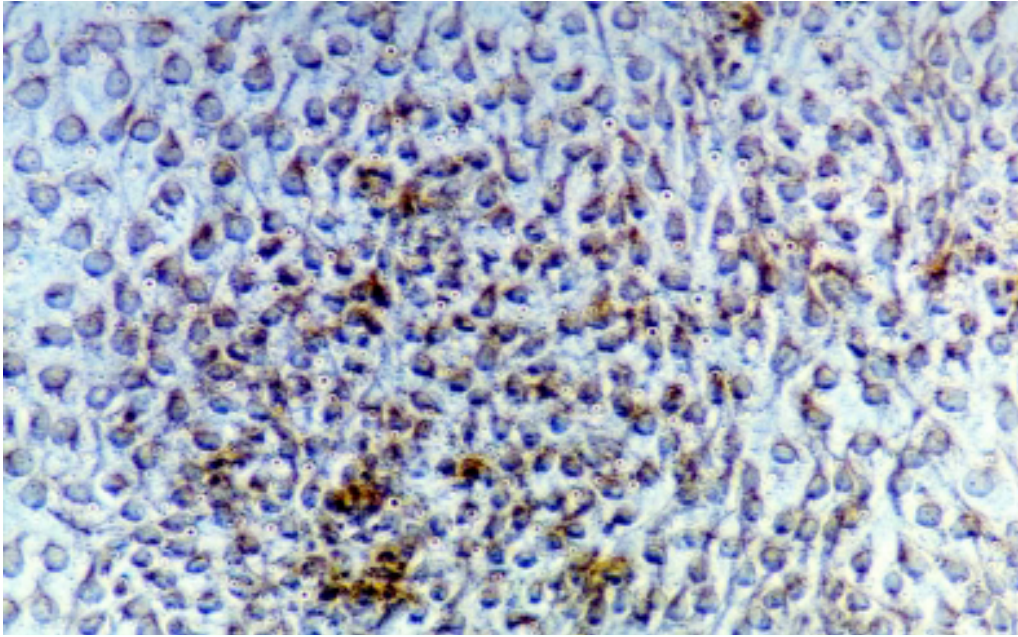


Abb. 5: Anfärbung der Zellkultur auf Vimentin sieben Tage nach Präparation (Vergrößerung 310fach).

4.3. Vitalität der Sertoli-Zellen nach Zugabe der zu untersuchenden Substanzen

Die Sertoli-Zellkultur wurde 24 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen des jeweiligen Schadstoffes inkubiert. Danach erfolgte die Bestimmung der Vitalität der Sertoli-Zellen mit Hilfe des MTT-Assays. MTT, ein gelber Farbstoff, wird von Zellen aufgenommen und zu einem blauen unlöslichen Formazanprodukt reduziert. Dieser Prozess findet ausschließlich in lebenden Zellen statt und benötigt die Aktivität von mitochondrialen Dehydrogenasen.

Bisphenol-A zeigte im Konzentrationsbereich 0-43 μM (0-10000 ng/ml) keinen Einfluss auf die Vitalität der Sertoli-Zellen (Abb. 6).

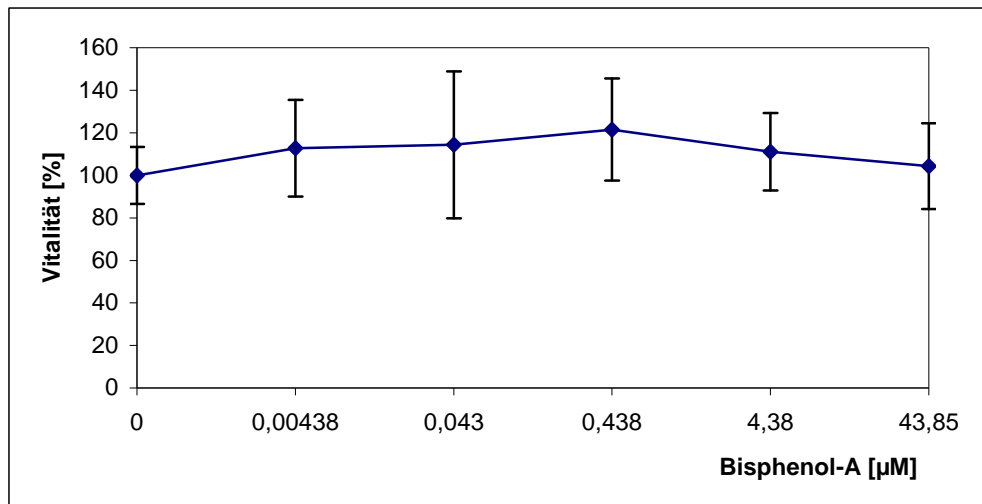


Abb. 6: Vitalität der Sertoli-Zellen nach 72 Stunden Inkubation mit Bisphenol-A. Gezeigt sind die Mittelwerte (\pm SD) von 6 eigenständigen Versuchen in Doppelbestimmung (n=6).

Abbildung 7 zeigt die Vitalität der Sertoli-Zellen nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen Daidzein. Es zeigte sich im niedrigen Konzentrationsbereich von 0-0,036 μ M nur ein geringer Einfluss auf die Vitalität. Im Messbereich von 3,6-36 μ M (1000-10000 ng/ml) wirkte Daidzein jedoch zytotoxisch. Ab einer Konzentration von 3,6 μ M Daidzein verringerte sich die Vitalität der Sertoli-Zellen um etwa 20%. Eine signifikante Verringerung der Vitalität der Sertoli-Zellen wurde ab einer Konzentration von 36 μ M Daidzein erreicht (um etwa 40%).

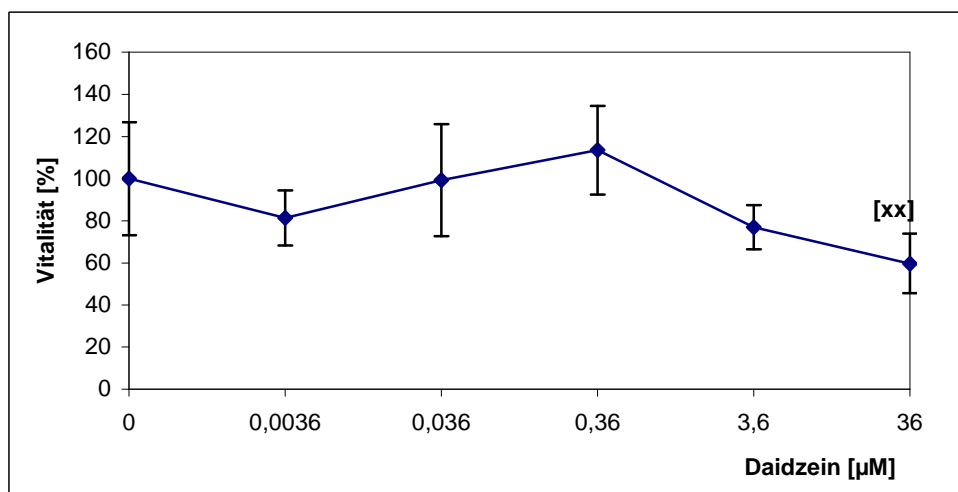


Abb. 7: Vitalität der Sertoli-Zellen nach 72 Stunden Inkubation mit Daidzein. Gezeigt sind die Mittelwerte (\pm SD) von 6 eigenständigen Versuchen in Doppelbestimmung (n=6), (xx) kennzeichnet ein Signifikanzniveau von ($p < 0,01$).

In fast allen Konzentrationsbereichen führte Ethinylöstradiol nicht zu einer negativen Beeinflussung der Zellaktivität der Sertoli-Zellen. Eine Minderung der Vitalität auf 65% ist, ab einer Konzentration von 0,0033 μM (1 ng/ml) Ethinylöstradiol nach 72 Stunden Inkubationszeit, zu erkennen, welche aber nicht signifikant ist (Abb. 8).

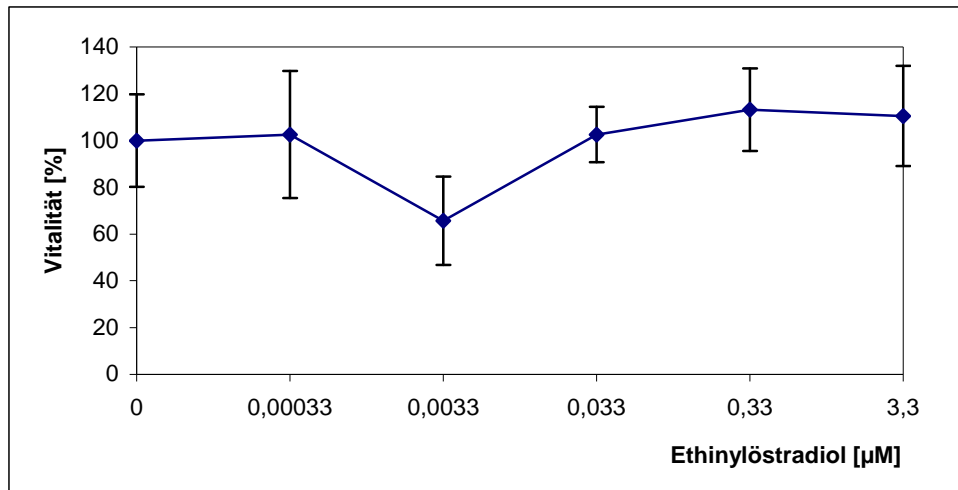


Abb 8: Vitalität der Sertoli-Zellen nach 72 Stunden Inkubation mit Ethinylöstradiol. Gezeigt sind die Mittelwerte (\pm SD) von 6 eigenständigen Versuchen in Doppelbestimmung (n=6).

Wie Abbildung 9 erkennen lässt, wirkte sich 17β -Östradiol in allen angegebenen Konzentrationsbereichen nicht auf die Vitalität der Sertoli-Zellen aus.

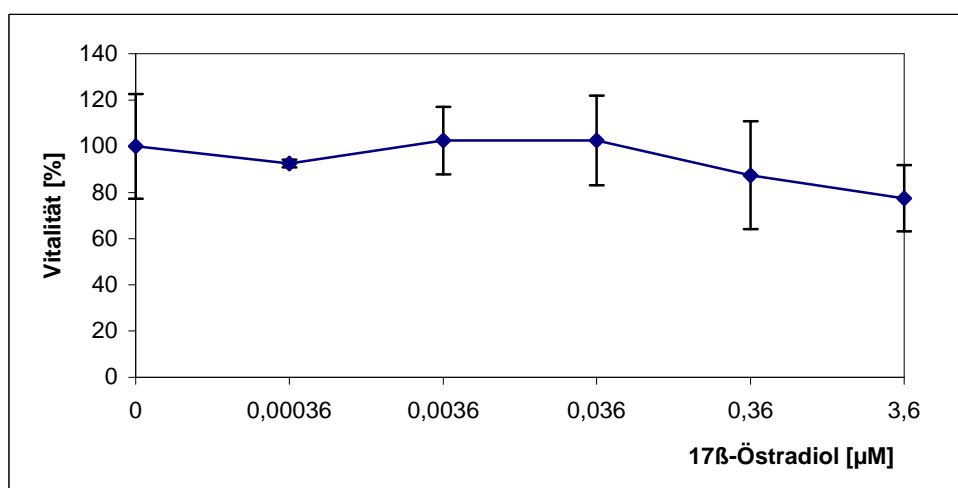


Abb. 9: Vitalität der Sertoli-Zellen nach 72 Stunden Inkubation mit 17β -Östradiol. Gezeigt sind die Mittelwerte (\pm SD) von 6 eigenständigen Versuchen in Doppelbestimmung (n=6).

Im untersuchten Konzentrationsbereich (0-3,3 μM) zeigte Moschus Keton keinen messbaren Einfluss auf die Zellvitalität (Abb. 10).

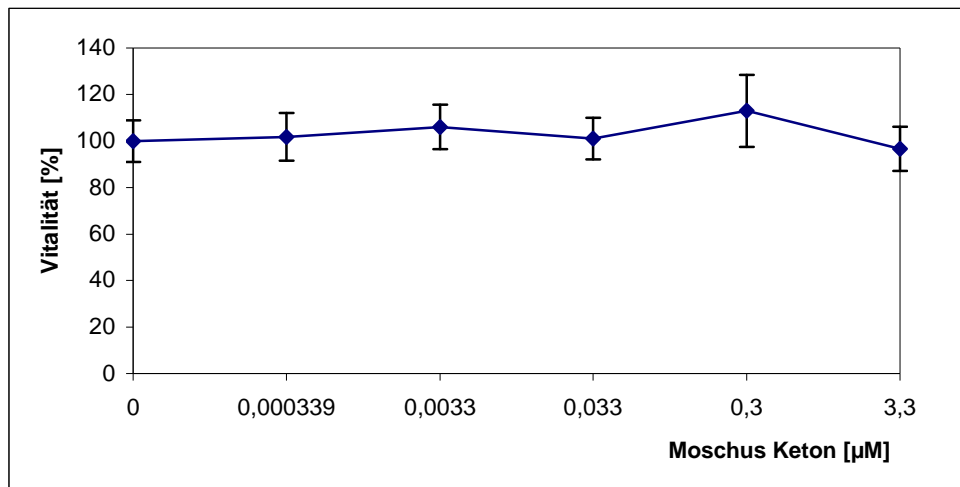


Abb. 10: Vitalität der Sertoli-Zellen nach 48 Stunden Inkubation mit Moschus Keton. Gezeigt sind die Mittelwerte (\pm SD) von 10 eigenständigen Versuchen in Doppelbestimmung (n=10).

Unter der Einwirkung von Moschus-Xylol ergaben sich keine Veränderungen der Vitalität der Sertoli-Zellen (Abb. 11).

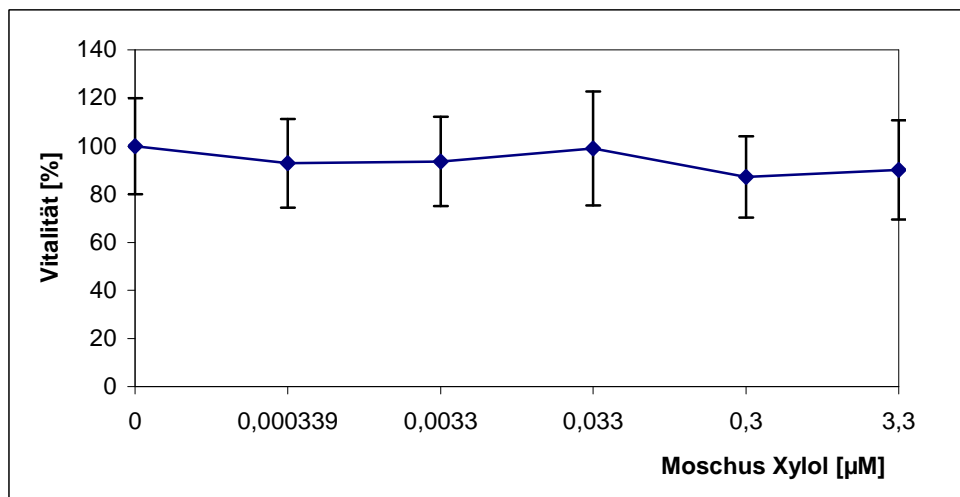


Abb. 11: Vitalität der Sertoli-Zellen nach 48 Stunden Inkubation mit Moschus Xylol. Gezeigt sind die Mittelwerte (\pm SD) von 10 eigenständigen Versuchen in Doppelbestimmung (n=10).

4.4. Laktatproduktion der Sertoli-Zellen nach Zugabe der zu untersuchenden Substanzen

Die Laktatproduktion der Zellen wurde mit Hilfe eines gekoppelten Enzymassays bestimmt. Dafür wurde die Sertoli-Zellkultur 72 Stunden mit Bisphenol-A, Daidzein, Ethinylöstradiol und 17β -Östradiol inkubiert. Bei den Sertoli-Zellen, die mit Nitromoschusverbindungen inkubiert wurden, betrug die Inkubationszeit nur 48 Stunden (s. Kpt. 3.4.1.).

Unter Bisphenol-A zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Laktatproduktion im Konzentrationsbereich $0,00438 \mu\text{M}$ (1 ng/ml) um 20%. Im Allgemeinen jedoch zeichnen sich nur geringfügige Änderungen der Laktatproduktion im Kurvenverlauf unter dem Einfluss von Bisphenol-A ab (Abb. 12).

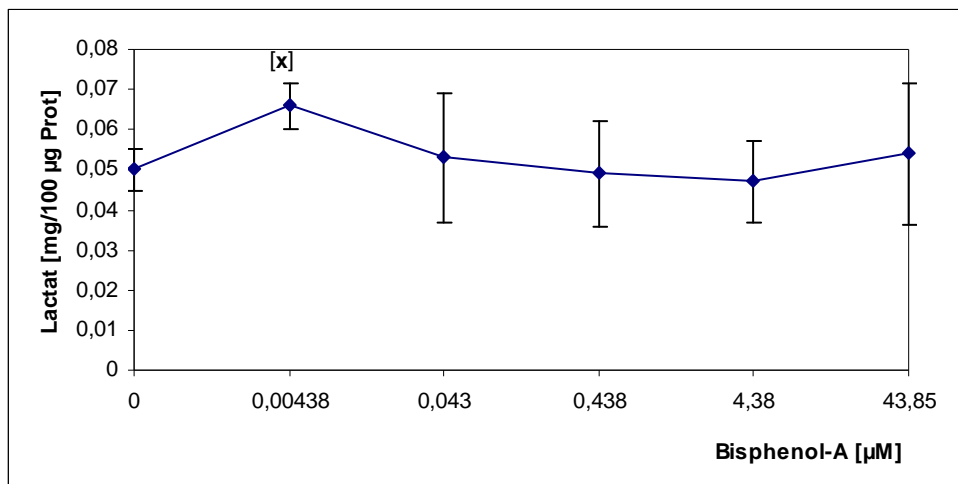


Abb. 12: Laktatproduktion der Sertoli-Zellen nach 72 Stunden Inkubation mit Bisphenol-A . Gezeigt sind die Mittelwerte (\pm SD) von 8 eigenständigen Versuchen in Doppelbestimmung ($n=8$), (x) kennzeichnet ein Signifikanzniveau von ($p<0,05$).

Unter dem Einfluss von Daidzein konnte innerhalb von 72 Stunden keine signifikante Änderung der Laktatproduktion festgestellt werden (Abb. 13).

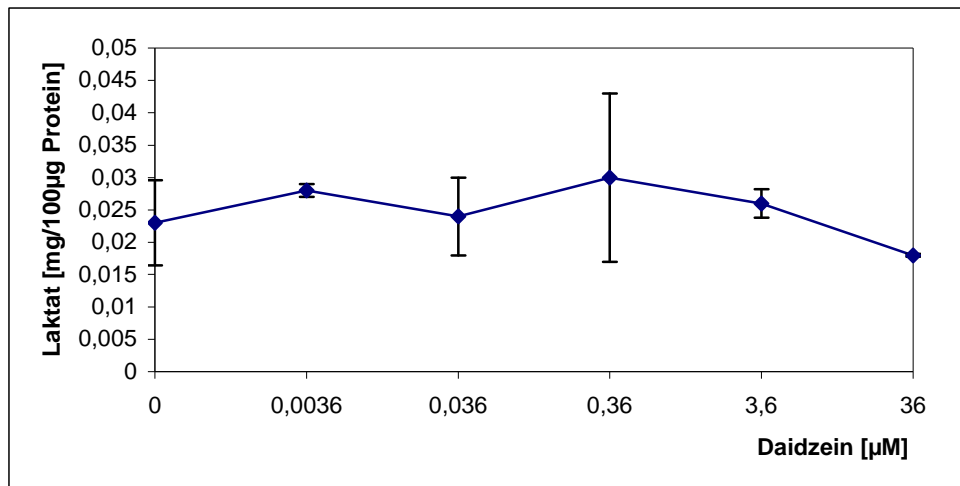


Abb. 13: Laktatproduktion der Sertoli-Zellen nach 72 Stunden Inkubation mit Daidzein. Gezeigt sind die Mittelwerte (\pm SD) von 5 eigenständigen Versuchen in Doppelbestimmung (n=5).

Niedrige Konzentrationen bis 0,0033 µM (1 ng/ml) Ethinylöstradiol zeigen im Kurvenverlauf nur geringfügige Änderungen der Laktatproduktion, nach 72 Stunden Inkubationszeit, an. Höhere Konzentrationen ab 0,033 µM Ethinylöstradiol jedoch führten nach 72 Stunden zu einer hochsignifikanten Zunahme der Laktatkonzentration im Zellkulturüberstand. 0,33 µM (100 ng/ml) Ethinylöstradiol steigerten die Laktatproduktion um das 1,5fache und 3,3 µM (1000 ng/ml) um das 4,3fache gegenüber der Kontrolle (Abb. 14).

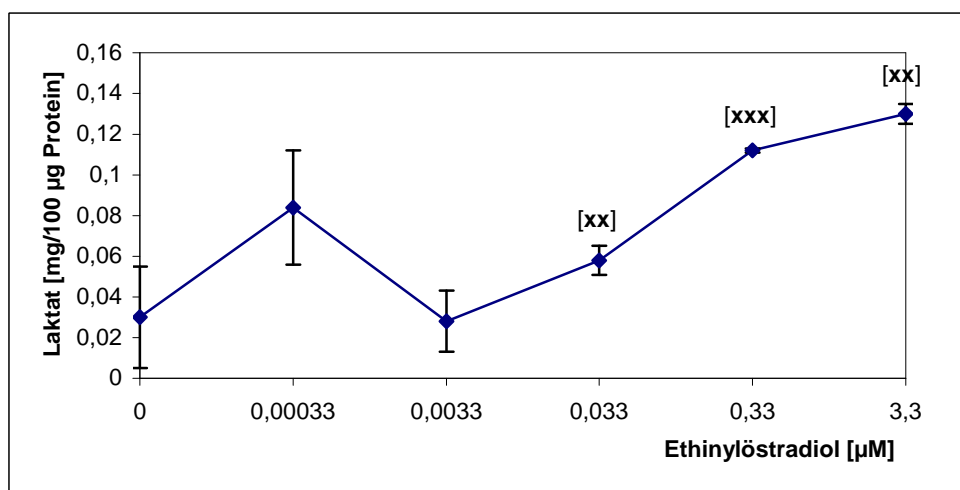


Abb. 14: Laktatproduktion der Sertoli-Zellen nach 72 Stunden Inkubation mit Ethinylöstradiol. Gezeigt sind die Mittelwerte (\pm SD) von 6 eigenständigen Versuchen in Doppelbestimmung (n=6), (xxx) und (xx) kennzeichnen ein Signifikanzniveau von ($p < 0,001$), ($p < 0,01$).

17 β -Östradiol wirkte sich dagegen nicht signifikant auf die Laktatproduktion der Sertoli-Zellen aus, was man dem Kurvenverlauf in Abb. 15 entnehmen kann.

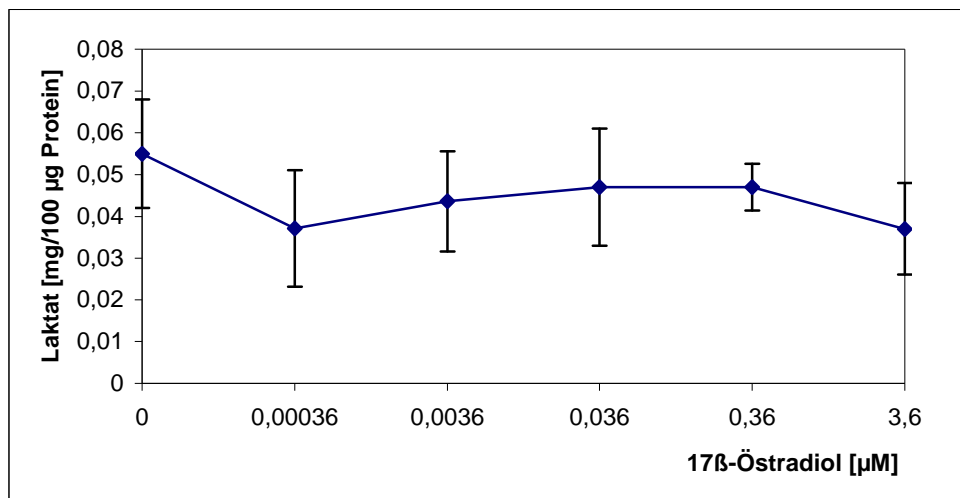


Abb. 15: Laktatproduktion der Sertoli-Zellen nach 72 Stunden Inkubation mit 17 β -Östradiol. Gezeigt sind die Mittelwerte (\pm SD) von 8 eigenständigen Versuchen in Doppelbestimmung (n=8).

Die Untersuchung mit Nitromoschusverbindungen (Moschus Keton und Moschus Xylol) zeigte nach 48 Stunden Inkubation nur einen geringen Einfluss beider Noxen auf die Laktatproduktion der Sertoli-Zellen. In Abbildung 16 zeichnet sich mit steigenden Konzentrationen an Moschus Keton eine sinkende Laktatproduktion ab, welche ab 0,3 μ M (100 ng/ml) Moschus Keton signifikant wurde. Hier reduzierte Moschus Keton die Laktatkonzentration der Sertoli-Zellen um 39% gegenüber der Kontrolle.

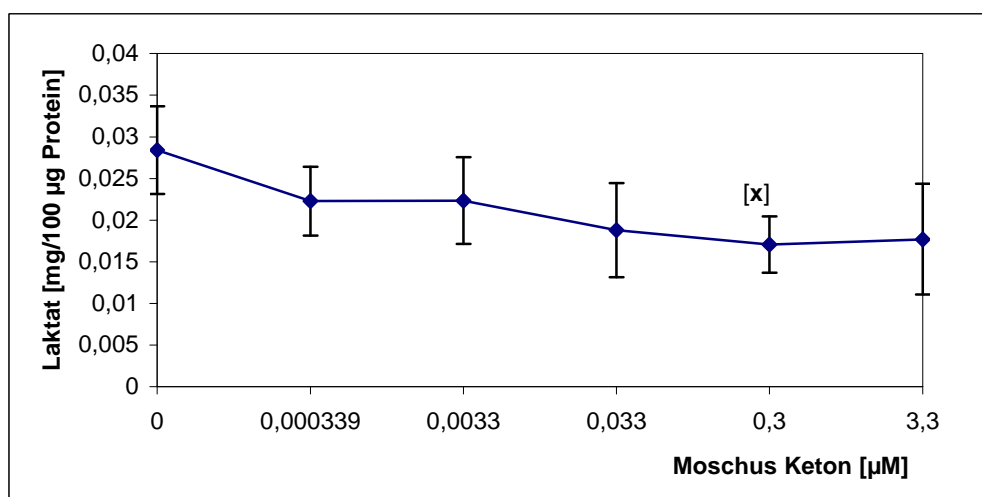


Abb. 16: Laktatproduktion der Sertoli-Zellen nach 48 Stunden Inkubation mit Moschus Keton. Gezeigt sind die Mittelwerte (\pm SD) von 4 eigenständigen Versuchen in Doppelbestimmung (n=4), (x) kennzeichnet ein Signifikanzniveau von ($p < 0,05$).

Moschus Xylol führte sowohl im niedrigen wie auch im höheren Konzentrationsbereich nicht zu einem Anstieg der Laktatproduktion der Sertoli-Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Der Kurvenverlauf (Abb. 17) zeigt zwar eine marginale Steigerung der Laktatproduktion unter Moschus Xylol im hohen Konzentrationsbereich, jedoch keinen signifikanten Anstieg.

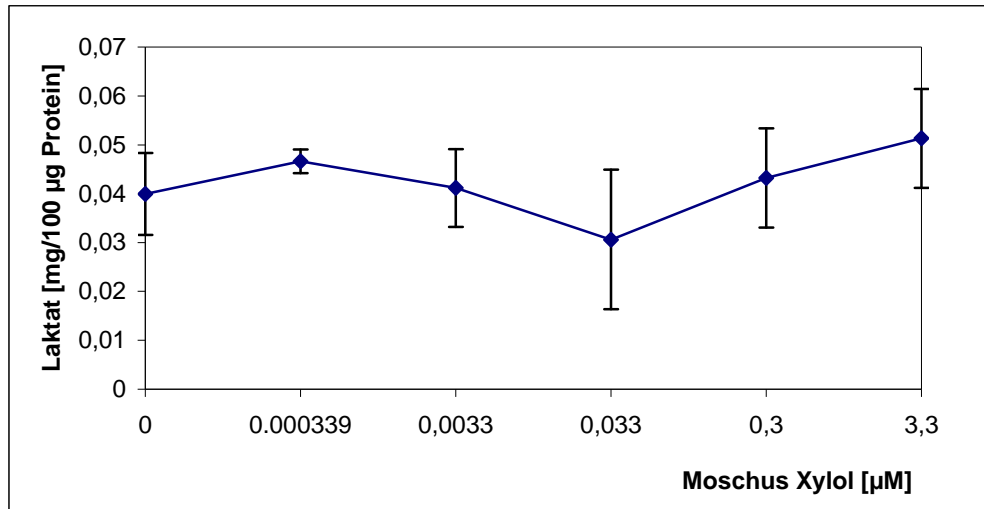


Abb.17: Laktatproduktion der Sertoli-Zellen nach 48 Stunden Inkubation mit Moschus Xylol. Gezeigt sind die Mittelwerte (\pm SD) von 4 eigenständigen Versuchen in Doppelbestimmung (n=4).

4.5. Inhibin-B-Sekretion der Sertoli-Zellen nach Zugabe der zu untersuchenden Substanzen

Für die Funktion der Sertoli-Zelle ist das Protein Inhibin ein spezifischer Parameter. Dieses Hormon wird nur in sehr geringen Mengen produziert und abgegeben. Es wurde ein hochsensitives ELISA zur Detektion verwendet. Die Sensitivität des Assays betrug 0,2 pg Inhibin/100 µg Protein/24 Std (s. Kpt. 3.4.2.).

Niedrige Konzentrationen von Bisphenol-A bis 0,438 µM beeinflussten die Inhibinproduktion der Sertoli-Zellen nicht. Ab dem Konzentrationsbereich von 100 ng/ml (4,38 µM) kam es dann mit steigender Konzentration des Bisphenol-A zu einer Verringerung der Inhibinsekretion der Sertoli-Zellen. Eine reduzierte Inhibinkonzentration um 24% (im Vergleich zur Kontrolle) zeigte sich nach 24 Stunden Inkubation der Sertoli-Zellen mit 10 000 ng/ml (43,85 µM) Bisphenol-A. Dieser Abnahme (bei 43,85 µM) ist als hoch signifikant einzustufen (Abb. 18)

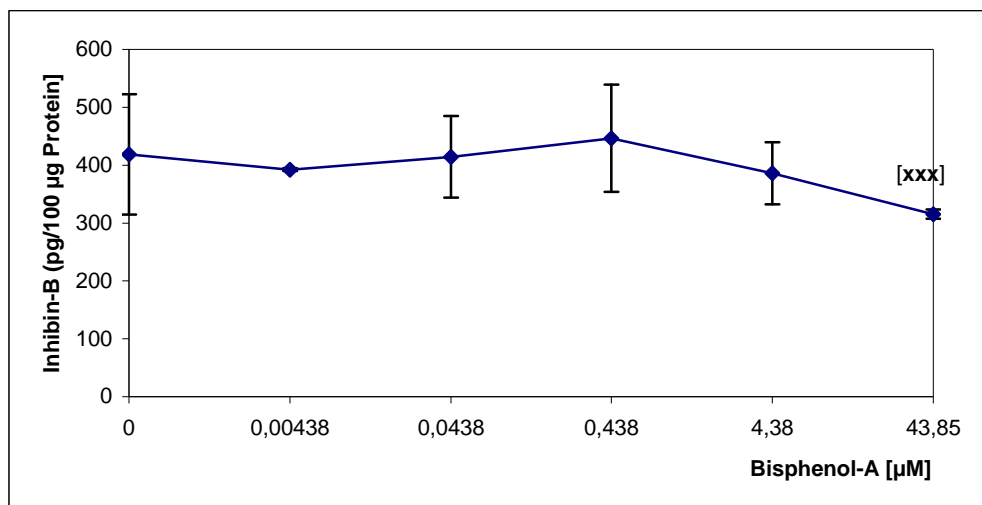


Abb. 18: Inhibinproduktion der Sertoli-Zellen nach 24 Stunden Inkubation mit Bisphenol-A. Gezeigt sind die Mittelwerte (\pm SD) von 6 eigenständigen Versuchen in Doppelbestimmung (n=6). (xxx) kennzeichnet ein Signifikanzniveau von ($p < 0,001$).

Daidzein zeigte im Gegensatz dazu weder im niedrigen noch im hohen Konzentrationsbereich signifikante Abweichungen der Inhibinsekretion (Abb. 19).

Unter niedrigen Daidzein-Konzentrationen tendiert die Inhibinsekretion zu leichtem Anstieg, während unter höheren Konzentrationen die Werte für Inhibin-B eher sinken.

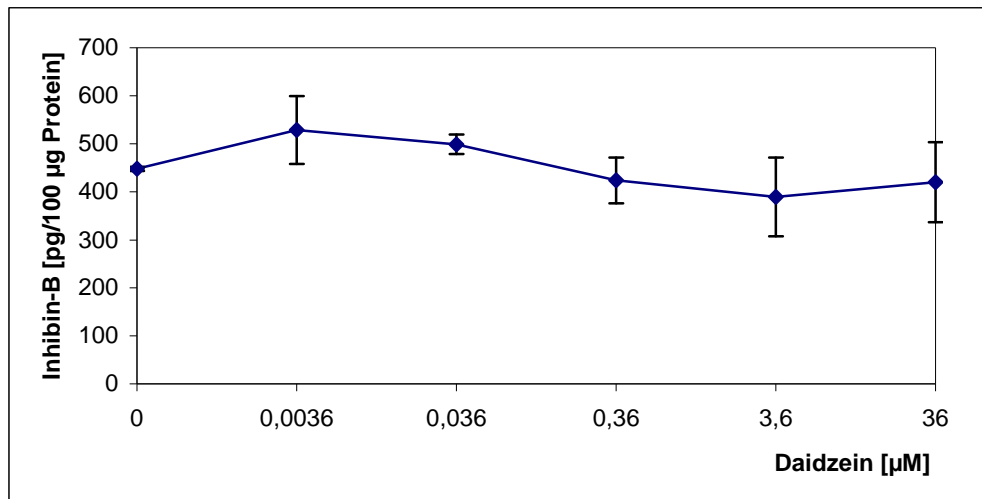


Abb. 19: Inhibinproduktion der Sertoli-Zellen nach 24 Stunden Inkubation mit Daidzein. Gezeigt sind die Mittelwerte (\pm SD) von 6 eigenständigen Versuchen in Doppelbestimmung (n=6).

Im Konzentrationsbereich von 0 bis 0,033 μ M Ethinylöstradiol (nach 24 Stunden Inkubationszeit) zeigte sich keine Veränderung der Inhibin-B-Werte. Eine signifikante bis hoch signifikante Steigerung der Inhibin-B-Sekretion der Sertoli-Zellen konnte ab 100 ng/ml (0,33 μ M) Ethinylöstradiol erkannt werden (Abb. 20).

So ist eine Steigerung der Inhibin-B-Sekretion um 72% nach einer 24-stündigen Inkubation der Sertoli-Zellen mit 3,3 μ M (1000 ng/ml) Ethinylöstradiol zu verzeichnen.

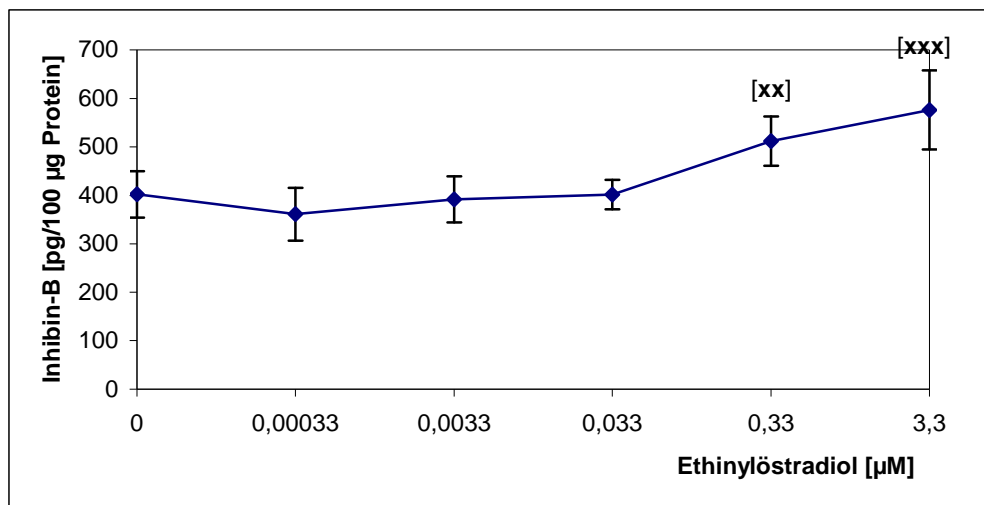


Abb. 20: Inhibinproduktion der Sertoli-Zellen nach 24 Stunden Inkubation mit Ethinylöstradiol. Gezeigt sind die Mittelwerte (\pm SD) von 8 eigenständigen Versuchen in Doppelbestimmung (n=8), (xx) und (xxx) kennzeichnen ein Signifikanzniveau von ($p < 0,001$), ($p < 0,01$).

Dagegen zeigt Abbildung 21 unter Einwirkung von 17β -Östradiol nur geringfügige Abweichungen der Inhibin-B-Werte im Kurvenverlauf. Unter zunehmenden Konzentrationen von 17β -Östradiol (0-1000 ng/ml) ergaben sich keine Veränderungen in der Inhibin-B-Sekretion der Sertoli-Zellen.

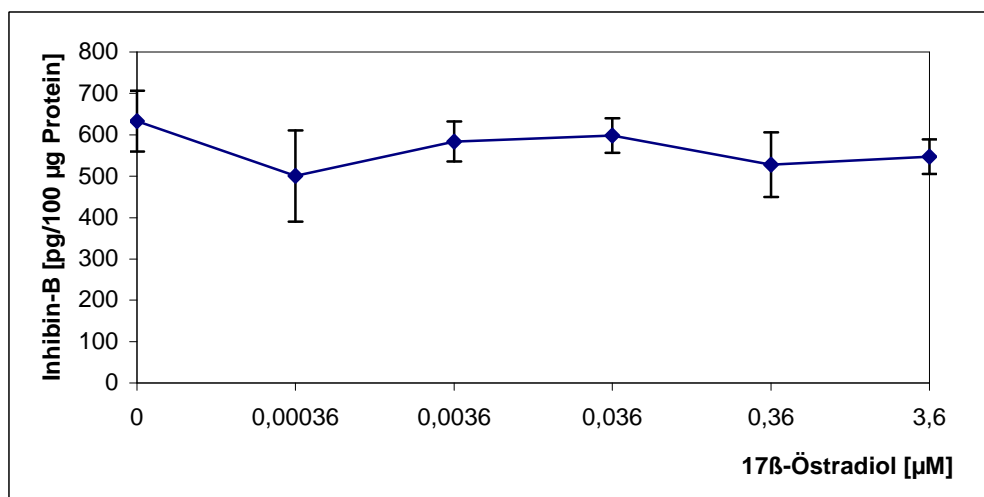


Abb. 21: Inhibinproduktion der Sertoli-Zellen nach 24 Stunden Inkubation mit 17β -Östradiol. Gezeigt sind die Mittelwerte (\pm SD) von 8 eigenständigen Versuchen in Doppelbestimmung (n=8).

Als Reaktion der Sertoli-Zellen auf die Zugabe von Moschus Keton kam es zu keiner konzentrationsabhängigen Veränderung der Inhibin-B Konzentration. Nur bei der am höchsten getesteten Konzentration von Moschus Keton (1000 ng/ml = 3,3 μ M) zeigte sich ein Rückgang der Inhibin-B Konzentration um 13% gegenüber der Kontrolle, der allerdings nicht signifikant war (Abb. 22).

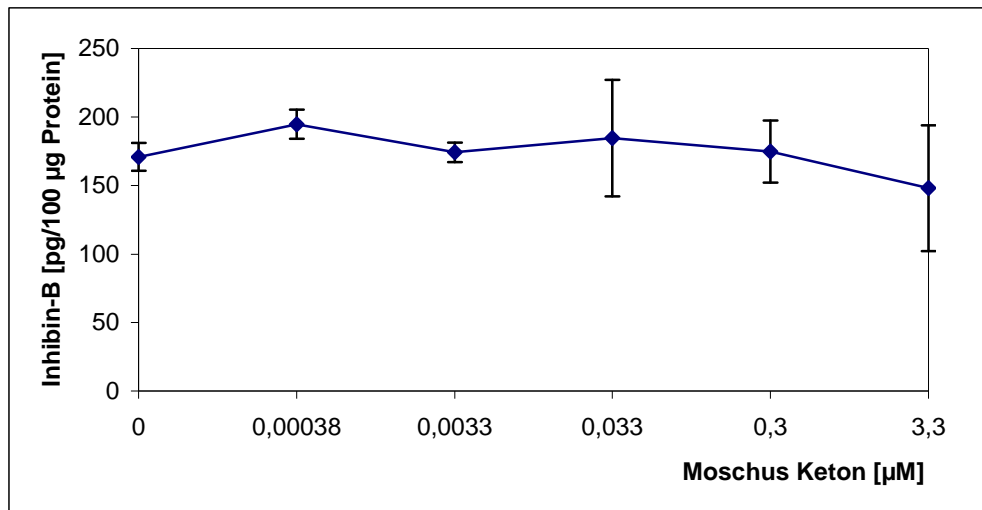


Abb. 22: Inhibinproduktion der Sertoli-Zellen nach 48 Stunden Inkubation mit Moschus Keton. Gezeigt sind die Mittelwerte (\pm SD) von 4 eigenständigen Versuchen in Doppelbestimmung (n=4).

Bei Moschus Xylol zeigte sich dagegen im hohen Konzentrationsbereich ab 10 ng/ml (0,033 μ M) eine leichte Abnahme der Inhibin-B Menge im Zellkulturüberstand, die bei der getesteten Konzentration signifikant war (Abb. 23).

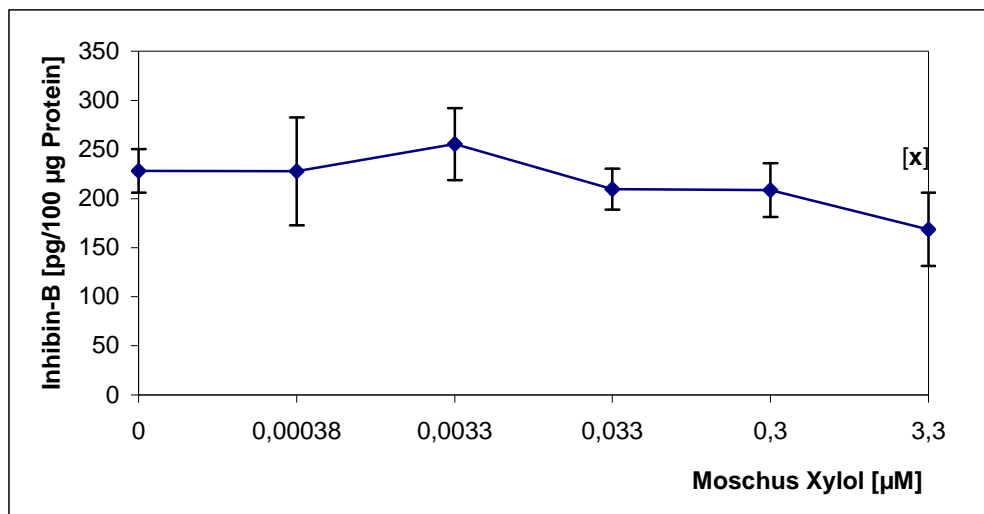


Abb. 23: Inhibinproduktion der Sertoli-Zellen nach 48 Stunden Inkubation mit Moschus Xylol. Gezeigt sind die Mittelwerte (\pm SD) von 4 eigenständigen Versuchen in Doppelbestimmung (n=4), (x) kennzeichnet ein Signifikanzniveau von ($p < 0,05$).

5 Diskussion

5.1. Methodische Aspekte

Primäre Aufgabe dieser Arbeit war es, ein in vitro Testsystem als mögliches Screening-Verfahren zu etablieren, das es ermöglicht, die reproduktionstoxische Potenz einer Noxe innerhalb kurzer Zeit beurteilen zu können. Bei der Bewertung eines Testsystems werden Probleme der praktischen Tätigkeit berücksichtigt. Zu Beginn der Diskussion soll daher eine Betrachtung dieser Probleme stehen, die vor allem im Bereich der Standardisierung und Optimierung auftraten.

Beim Anlegen der Zellkultur konnte auf die schon bestehenden Erfahrungen der Arbeitsgruppe zurückgegriffen werden. Das wesentliche Problem lag in der Zellseparation. Die Gewinnung von Einzelzellen stellte sich zu Beginn als schwierig dar, war aber notwendige Voraussetzung, um eine möglichst gleich große Zellpopulation in den einzelnen Kulturschalen zu erhalten. Die Verwendung eines 70 µm Nylonsiebes nach enzymatischer und grober mechanischer Trennung führte zwar zu einer Reduktion der Gesamtzahl gewonnener Zellen, resultierte aber in einer Eliminierung der Zellcluster, so dass im wesentlichen Einzelzellen gewonnen wurden. Daher wurde dieser Schritt bei der Zellpräparation hinzugefügt, der so in bisherigen Publikationen nicht beschrieben ist (Hadley et al., 1985; Onoda et al., 1990; Monsees et al., 1996).

Bei der Anwendung der einzelnen Assays ergaben sich kleinere Probleme. Die Detektion von Laktat ist eine seit vielen Jahren in der Biochemie verwendete Methode. Bisherige Testkits arbeiteten mit weitaus größeren Probenvolumina, als sie für diese Arbeit zur Verfügung standen. Der Testkit (Sigma Diagnostics), welcher hier Verwendung fand, arbeitete mit geringen Volumina.

Das wesentliche Problem bei der Inhibinbestimmung lag zum einen in der äußerst geringen Konzentration des Inhibins in den Proben, zum anderen in der, durch das komplizierte und langwierige Testverfahren, verursachten Störanfälligkeit des Assays. In Vorversuchen zeigte sich, dass es trotz Einhaltung der vom Hersteller des Assays angegebenen Methode zur Konservierung der Proben durch Einfrieren bei -80°C, zu einem relevanten Abbau des Inhibins nach etwa 14 Tagen gekommen war. Die Proben wurden daher möglichst unmittelbar nach Versuchsende bzw. spätestens innerhalb einer Woche weiter bearbeitet. Je nach Zellpräparation zeigte sich außerdem, dass die basale Inhibinsekretion der Zellen stark variierte, wobei die Standardabweichung des Inhibingehaltes der Proben einer Präparation

aber konstant blieb. Zum Teil lagen die gesamten Messwerte einer Versuchsreihe unterhalb der Nachweisgrenze. Es konnte gezeigt werden, dass junge Ratten eine deutlich höhere Inhibinproduktion haben als ältere Tiere (Rivier et al., 1988). Da die für die Versuche eingesetzten Tiere zwischen 18 und 21 Tage alt waren und gerade in dieser Alterstufe relativ starke Unterschiede im Inhibinspiegel auftreten, wird dies die wahrscheinliche Ursache für die Variation der basalen Inhibinsekretion sein.

Die Proteinbestimmung erfolgte mit der Methode nach Lowry et al. (1951). Die Werte lagen relativ konstant (allerdings abhängig von der jeweiligen Präparation) zwischen 60 und 100 µg pro Well in einem Volumen von 1ml und bei einer Zellzahl von 10^6 Zellen/ml (s. Kpt. 3.3.3). Wie in Kpt. 3.5 schon angedeutet, kann es durch mehrfachen Mediumwechsel zu Zellverlusten kommen, die am sinkenden Proteingehalt abzulesen sind. Mit Schwankungen der Proteinkonzentrationen (durch Zellverluste) musste also während der Experimente gerechnet werden, so dass die Ergebnisse der MTT-, Laktat- und Inhibinmessung dadurch beeinflusst wurden.

In vorausgegangenen Studien wurde meist mit größeren Zellzahlen gearbeitet. Williams und Forster (1988) verwendeten beispielsweise $4\text{-}5 \times 10^6$ Zellen pro ml Medium, allerdings ohne die Angabe der Proteinmenge. Chapin et al. (1988) arbeiteten bei einer Studie über den Einfluss von Phthalatestern auf Sertoli-Zellkulturen mit einem Volumen von 26 ml pro Well und einem Proteingehalt von 1,8-2,5 mg. Dies entspricht 70-100 µg Protein/ml. Leider finden sich hier keine Angaben zur Zellzahl.

Das gesamte Testsystem „Sertoli-Zelle“ zeigte sich insgesamt wenig störanfällig. Im praktischen Umgang erwies es sich, was Handhabung, Zeitaufwand und Wirtschaftlichkeit angeht, den Anforderungen gewachsen. Es ist möglich, innerhalb von etwa 10 Tagen das gesamte Testsystem mit einer Testsubstanz durchzuführen. Dabei entfallen etwa 6 Tage auf die Präparation und das Anlegen der Zellkultur, die verbleibenden 4 Tage auf die Durchführung der einzelnen Assays. Der Inhibin-Assay verursacht aber durch lange Inkubationszeiten den größten Zeitaufwand. Um statistisch sichere Ergebnisse zu erhalten, wurden diese Experimente aber noch mindestens dreimal wiederholt.

Abgesehen von den praktischen Belangen zeigt sich bei der Interpretation der Ergebnisse, dass sich die Auswahl und vor allem die Kombination der Testparameter vorteilhaft auf die Aussagekraft des Testsystems auswirkte. In vorausgegangenen Studien (Williams und Foster,

1988; Chapin et al., 1988) wurden meist morphologische Gesichtspunkte als Referenz für die Vitalität der Zellkulturen verwendet. Diese besitzen, im Gegensatz zur Vitalitätsbestimmung der Sertoli-Zellen, nur eine geringe Trennschärfe, so dass die Korrelationen zu den gemessenen biochemischen Parametern nur bedingt möglich sind.

Somit bietet die Verwendung des MTT-Assays die Möglichkeit der Ermittlung von subtoxischen Konzentrationen der verwendeten Schadstoffe, bei denen wohl die Zellfunktion, nicht aber die Vitalität signifikant beeinflusst wird. Damit ist auch eine Aussage darüber möglich, ob das nachgewiesene Laktat bzw. Inhibin aus stoffwechselaktiven lebenden oder aus avitalen lysierten Zellen stammt.

Im Vergleich mit in vivo-Studien zeigten sich die Grenzen in der Verwendung von Monozellkulturen. Wie im dritten Kapitel ersichtlich, wurde dem Kulturmedium nur bis zum Tag vor Versuchsbeginn FSH hinzugefügt. Diese Stimulation sollte bei den eigentlichen Untersuchungen keine Rollen spielen, um nur den tatsächlichen Einfluss der Noxe zu messen. Die Relevanz der Ergebnisse wird aber durch diese unphysiologischen Verhältnisse eingeschränkt.

In Bezug auf unterschiedliche hormonelle Interaktionen der Zellen, unter Verwendung von Monozellkulturen, ist allerdings keine Aussage möglich. Eine Lösung wäre dabei das Anlegen von Co-Kulturen (z.B. Sertoli- und Leydig-Zellen), wie es mit Sertoli-Zellen auch schon durchgeführt worden ist (Foucault et al., 1994). In der Praxis können dafür primär Monozellkulturen angelegt werden, welche dann mit Hilfe eines Zwei- oder Mehrkammersystems zu einer Co-Kultur vereint werden. Getrennt werden diese Kammern durch eine Membran, die die Interaktion der Zellpopulationen ermöglicht.

Das Anlegen einer Sertoli-Keimzell-Co-Kultur ist dazu geeignet, morphologische Parameter wie z.B. die Loslösung der Keimzellen von den Sertoli-Zellen (sog. Detachment) zu untersuchen (Reader und Foster, 1990). Hierfür ist es notwendig, die entsprechenden Schritte zur Sertoli-Zell-Separation (hypotoner Schock) bei der Präparation wegzulassen (s. Kpt. 3.3.4). Der Nachteil einer solchen Kultur liegt sicher in der unvorhersehbaren Zusammensetzung der Zellpopulation, auch in Abhängigkeit vom Alter des Tieres. Die Verwendung von Co-Kulturen bietet somit die Möglichkeit, spezielle Fragestellungen zu untersuchen, bei denen die Interaktion von Zellpopulationen eine Rolle spielen. Dabei muss allerdings beachtet werden, dass auch Co-Kulturen nur eine Annäherung an die physiologischen Bedingungen darstellen.

5.2. Diskussion der Ergebnisse

In den entwickelten Industrienationen ist es gerade in den letzten Jahren zu einem Anstieg infertiler Paare gekommen. Ein Grund hierfür ist sicherlich auch ein Rückgang der durchschnittlichen Spermienzahl bei Männern um etwa 50% innerhalb der letzten 50 Jahre (Carlsen et al., 1992). Im Bereich der Reproduktionsbiologie werden insbesondere Umweltschadstoffe für den Rückgang der Fertilität bei Männern verantwortlich gemacht. Von besonderem Interesse ist daher die Wirkung dieser Schadstoffe auf die Reproduktionsorgane des Mannes, wobei eine exogene Beeinflussung der Physiologie oder der Morphologie der Sertoli-Zellen dafür verantwortlich sein könnte.

Um das Ziel dieser Arbeit zu erreichen, ein geeignetes in vitro System zu entwickeln, welches den Einfluss von Umwelttoxinen (Xenoöstrogenen) auf die Funktion testikulärer Zellen, überprüft, wurden Sertoli-Zell-Monokulturen verwendet, da sie essentiell für den Ablauf der Spermatogenese sind. Die Untersuchungen von Carrier et al. (1985); Chapin et al. (1988) und Zhuang et al. (1989) basieren auf diesen Monokulturen.

Spezifische und unspezifische biochemische Marker der Zellfunktionen der Sertoli-Zellen stellen die Inhibin- und Laktatproduktion der Sertoli-Zellen dar. Diese sind geeignet, um die Toxizität unterschiedlicher Chemikalien zu untersuchen, da einige von diesen Funktionen oft eine deutliche Veränderung nach Noxenexposition zeigen.

Die Laktatproduktion ist in besonderem Maße für die sich entwickelnden Spermatozyten und reifen Spermatozoen wichtig, da Laktat für diese als Nährstoff dient. In vitro haben Sertoli-Zellen eine hohe Glykolyserate und sezernieren Laktat und Pyruvat (Robinson und Fritz, 1981). Zu hohe Sekretionsraten an Laktat können sich jedoch, durch die Ansäuerung des extrazellulären Raumes, schädigend auf die Spermatogenese auswirken. Durch den Protonenaustausch von intra- nach extrazellulär kann es, im Rahmen der Glykolyse, zu einer Schädigung der benachbarten Keimzellen kommen. Dies spricht dafür, dass die steigende Laktatsekretion eine sensitive und spezifische Reaktion auf eine Exposition mit Noxen ist.

Nach Exposition mit Phthalat-Estern (Williams und Foster, 1989), Nitrobenzol (Allenby et al., 1990), Gossypol (Monsees et al., 1998a), Metallionen (Monsees et al., 1998b), Pestiziden (Monsees et al., 2000) sowie PCBs (Raychoudhury et al., 2000) konnte ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Laktatsekretion beobachtet werden.

Schadstoffe, welche erwiesenermaßen auf die Sertoli-Zelle einwirken, steigern bereits in sehr geringen Konzentrationen die Laktat- und Pyruvat-Sekretion. Beispiele hierfür sind z.B. 1,3-Dinitrobenzol (1,3-DNB) oder Mono-(2-Ethylhexyl)-phthalat (MEHP) (Williams und Foster, 1988). Dagegen zeigten Di-(2-Ethylhexyl)-phthalat sowie der Metabolit 2-Ethylhexanol in vivo keinen Einfluss auf die Sertoli-Zelle. So wurde bei diesen Substanzen, im entsprechenden in-vitro Modell, auch keine Änderung der Laktat- oder Pyruvat-Produktion beobachtet (Williams und Foster, 1988).

Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation zeigten, dass durch die Inkubation der Sertoli-Zellen mit Bisphenol-A und 17- β Östradiol keine Änderung der Laktatkonzentration im Zellkulturüberstand herbeigeführt wurde. Im Gegensatz dazu kann aber Bisphenol-A z.B. bestimmte Enzyme hemmen, wie die Aktivität der Aminopyrin-N-Demethylase in humanen Leberzellen, die Aktivität der Cytochrom P450 vermittelten S-Mephenytoin-4-Hydroxilierung (Niwa et al., 2000), oder die testikuläre Ca^{2+} -ATPase (Hughes et al., 2000), die auch in Sertoli-Zellen vorkommt.

Die Exposition mit 17 α -Ethinylöstradiol führte zu einer dosisabhängigen, signifikanten Steigerung der Laktatproduktion. Der Höchstwert wurde bei 1000 ng/ml (3,3 μM) Ethinylöstradiol, mit einer Steigerung der Laktatkonzentration um das 4,3fache (gegenüber der Kontrolle), erreicht (Abb. 14). Niedrige Konzentrationen des Phytoöstrogens Daidzein (0,0036 μM) führten ebenfalls zu einer geringen Steigerung der Laktat-Sekretion der Sertoli-Zellen, während sich bei höheren Daidzein-Konzentrationen (0,036-3,6 μM) die Laktat-Menge wieder verringerte (Abb. 13). Dies kann hier aber auf die Zytotoxizität des Phytoöstrogens in diesem Konzentrationsbereich (3,6-36 μM = 1000-10000 ng/ml) zurückgeführt werden, da die Vitalität der Sertoli-Zellen nach Exposition mit Daidzein konzentrationsabhängig zwischen 10-25 % abnahm (Abb. 7). Bisphenol-A, Ethinylöstradiol und 17 β -Östradiol wirkten sich allerdings in allen getesteten Konzentrationbereichen nicht negativ auf die Vitalität der Sertoli-Zellen aus. Raychoudhury et al. (2000) bestätigte zB., dass nach Exposition mit 1 μM 17 β -Östradiol keinerlei Schäden der Vitalität oder Morphologie der Sertoli-Zellen in Primärkultur aufzuweisen waren. Nachweislich zeigten sich morphologische Veränderungen an Sertoli-Zellen erst, wenn es im MTT-Assay zu einem Abfall der Werte auf etwa 50% der Ursprungsaktivität gekommen ist (Janecki et al., 1992) Auch beim DNA-Gehalt der Zellen kommt es später als beim MTT-Assay zu statistisch signifikanten Veränderungen (Janecki et al., 1992).

Es sind durchaus Unterschiede in der Art der Laktatproduktion der Sertoli-Zellen zu erkennen. Dies zeigte sich auch in den hier durchgeführten Versuchen mit Ethinylöstradiol. Erst ab einer Konzentration von 0,033 μM , nach 72 Stunden Inkubationszeit dieser Substanz, kam es zu einem signifikanten Anstieg der Laktatkonzentration, so dass hier wahrscheinlich keine Östrogenrezeptor-vermittelten Effekte vorlagen. Lindan (γ -Hexachlorcyclohexan) z.B. verursachte erst ab einer Konzentration von 6,25-12,5 μM eine dosisabhängige Steigerung der Laktat-Sekretion um das 1,7-fache. DDT ([1,1-bis(4-Chlorophenyl)-2,2,2-trichlorethan) dagegen bewirkte eine signifikante dosisabhängige Verringerung der Laktat-Sekretion (Monsees et al., 2000). Da die Ergebnisse der Laktatproduktion der Sertoli-Zellen nach Inkubation mit verschiedenen Östrogenen so unterschiedlich ausfielen, sind wahrscheinlich verschiedene molekulare Mechanismen dafür verantwortlich, z.B. die Beeinflussung der Aktivitäten, der für die Glykolyse relevanten Enzyme. Raychoudhury et al. (2000) zeigten, daß das PCB Kongener 77 erst in Konzentrationen von 0,1-1 μM zu einem signifikanten Anstieg der Laktatproduktion führte, so dass auch dort wohl kein durch Östrogenrezeptoren vermittelter Effekt vorlag.

Einen Überblick über mögliche Östrogenrezeptor-vermittelte Wirkung am menschlichen Hoden soll folgendes Schema (Abb. 24) geben, aus dem deutlich hervorgeht, dass die verschiedenen Zellen des Hodens (z.B. Leydig- oder Sertoli-Zellen) Östrogenrezeptoren besitzen, über welche östrogenartige Substanzen wirken können, wobei sich die verschiedenen Zellgruppen auch untereinander steuern.

Die synthetischen Moschusduftstoffe hatten im Konzentrationsbereich 0-1000 ng/ml (0,0 - 3,3 μM) keinen signifikant negativen Einfluss auf die Laktatproduktion und die Vitalität der Sertoli-Zelle. Konzentrationen von 100-1000 ng/ml (0,3-3,3 μM) Moschus Keton bewirkten eine sehr geringe Abnahme der Laktatmenge. Die Abnahme der Laktatproduktion, bei steigenden Konzentrationen der Nitroaromaten, könnte durch die Amino-Metaboliten der Nitroaromaten bedingt sein (Siol, 2002). Ob auch die Vitalität der Sertoli-Zellen, besonders durch die Amino-Metabolite der Nitroaromaten abnimmt, wie bei den Leukämia-Zellen nachgewiesen, müsste in weiteren Tests untersucht werden. Zytotoxikologische Resultate mit belegten oben genannten Abbau des Moschus Keton (Siol, 2002) wie folgt: Am Beispiel des Moschus Ketons wurde dargestellt, dass Moschus Keton auf reduktivem Wege von Sertoli-Zellen umgesetzt und ausgeschieden wird.

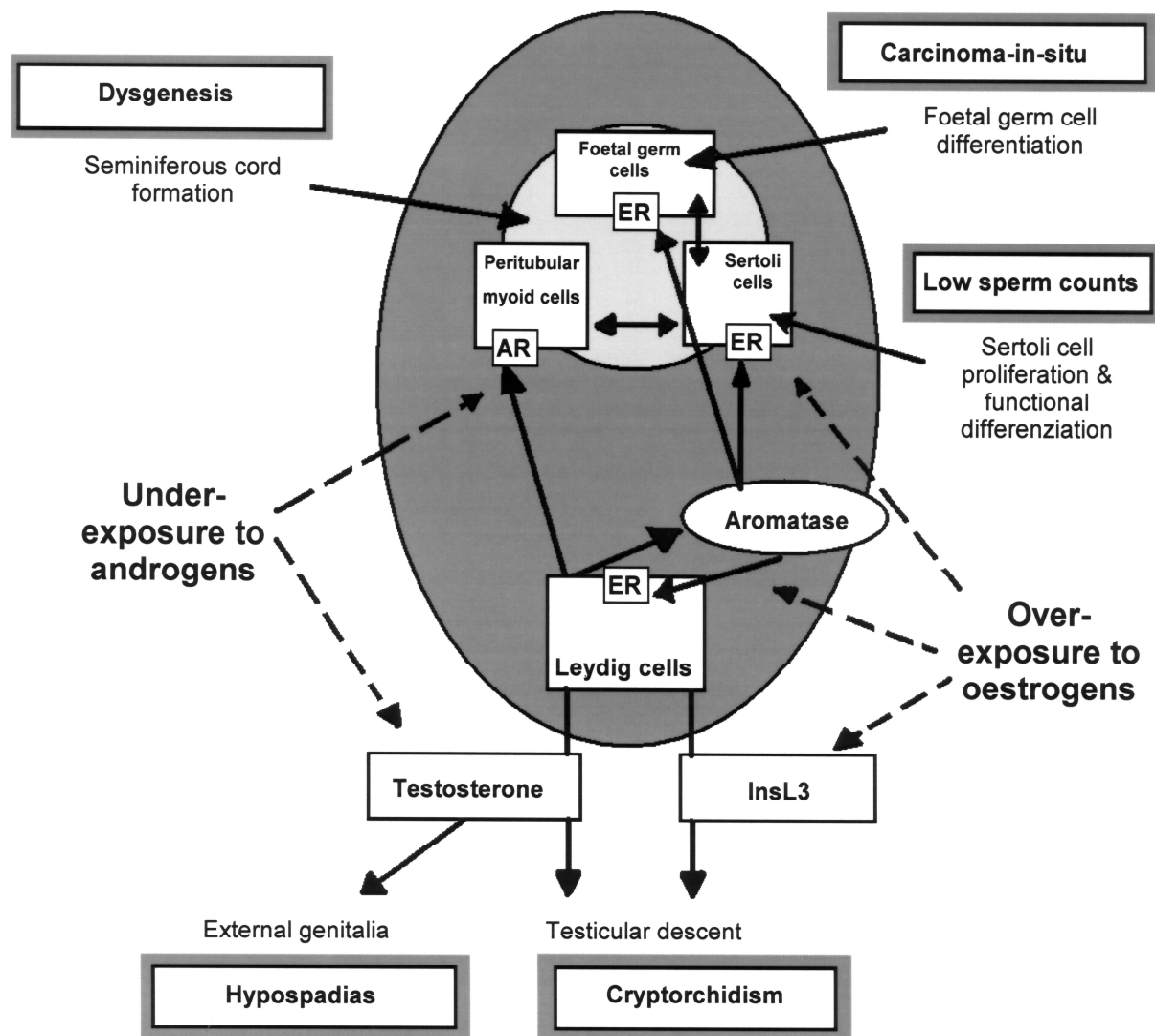


Abb. 24: Differenzierung, Entwicklung und Interaktionen der Zellen im menschlichen Hoden (Sharpe, 2003)

Bereits nach 24 Stunden konnten in den Überständen neben der Muttersubstanz Moschus Keton die beiden entstandenen Metabolite 2-Amino-Moschus-Keton (2-A-MK) und Di-Amino-Moschus-Keton (DiAMK) nachgewiesen werden.

Im Vergleich dazu wurden die Sertoli-Zellen dieser Arbeit für die Vitalitäts-, Laktat- und Inhibinbestimmung 48 Stunden inkubiert.

Es ist demnach anzunehmen, dass auch hier eine Reduktion, zumindest von Moschus Keton, stattgefunden hat. Diese Transformation des lipophilen Moschus Keton scheint durch Exo-Enzyme zu erfolgen (Sjol, 2002).

Zur Darstellung möglicher Metabolisierungsvorgänge des Moschus Keton soll Abbildung 25 dienen. Dieses Schema verdeutlicht, wie auf reduktivem bzw. oxidativem Wege

verschiedener chemischer Gruppen des Moschus-Keton unterschiedliche Metabolite entstehen.

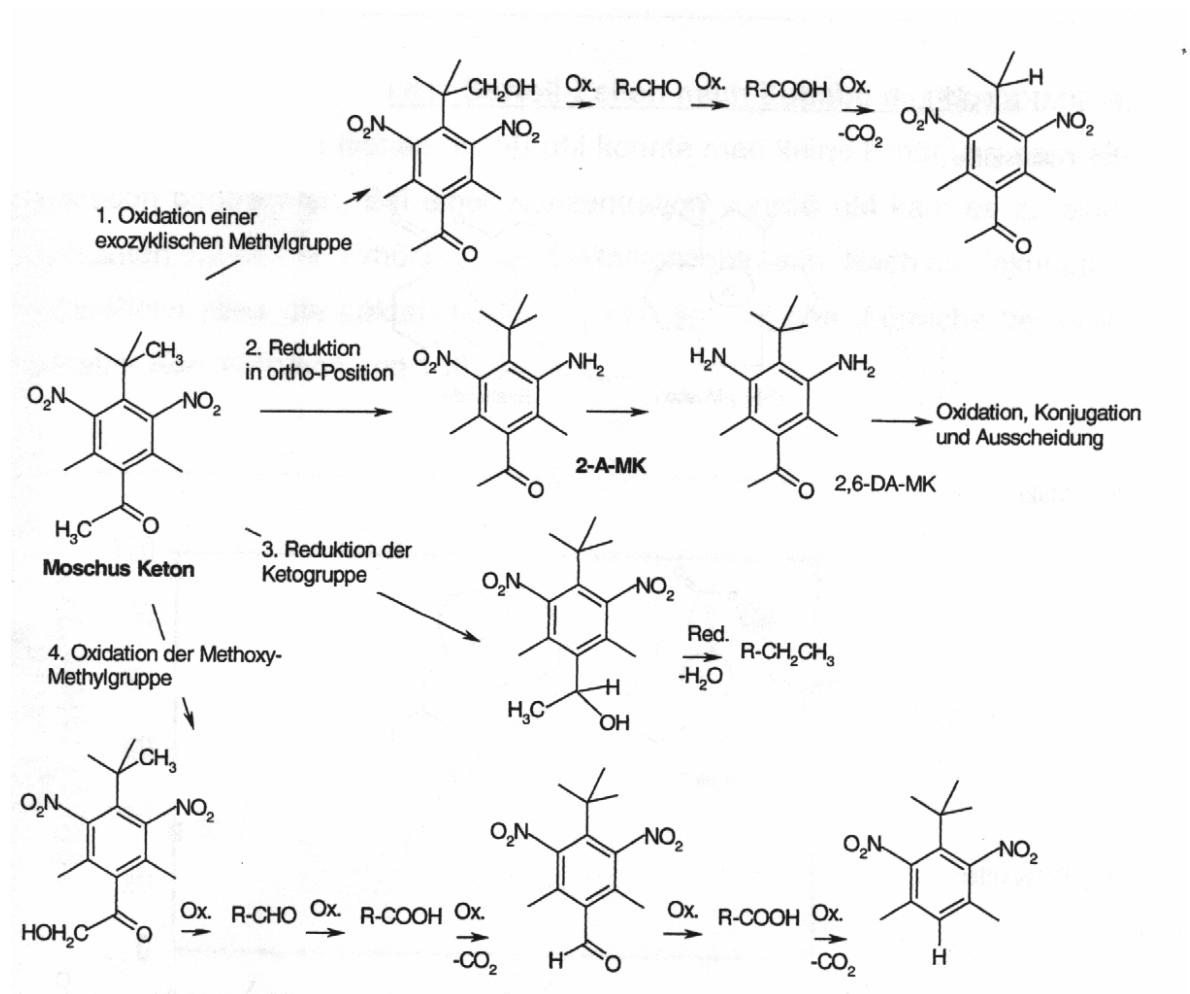


Abb. 25: wichtige Metabolisierungsreaktionen des Moschus Keton im Überblick (Siol, 2002)

Die Beeinflussung der Inhibinproduktion durch unterschiedliche Schadstoffe wird in Arbeiten von Monsees et al., 1998a+b; Depuydt et al., 1999; Monsees et al., 2000 und Berlau et al., 2000 beschrieben. Cadmium z.B. führt in hoher Dosierung zur Abnahme der Inhibinproduktion in-vitro, wahrscheinlich bedingt durch direkte zytotoxische Wirkung (Janecki et al., 1992).

Die Synthese und Sezernierung von Inhibin-B, einem Proteinhormon, erfolgt ebenfalls durch die Sertoli-Zelle. Inhibin-B fungiert deshalb als spezifischer Parameter der Sertoli-Zelle, welcher über eine endokrine Rückkopplungsschleife, die Ausschüttung von FSH aus der Hypophyse (De Krester und Robertson, 1989) reguliert. Ein Inhibinabfall ist unter physiologischen Bedingungen verbunden mit einem Anstieg der hypophysären FSH-Sekretion und damit einer Stimulation der Sertoli-Zellen.

In vivo Studien, die den Einfluss unterschiedlicher Noxen auf die Inhibin-B Sekretion bzw. die hypophysäre FSH-Sekretion testeten, kamen zu unterschiedlichen Ergebnissen. So führte die orale Gabe von 15 mg/kg Gossypol über 16 Wochen zu einer signifikanten Zunahme des FSH-Spiegels bei Ratten (Kainz et al., 1988). Ein erniedrigter FSH-Spiegel wurde dagegen, bei einer Dosis von 20 mg/kg Gossypol über 2 Wochen, beobachtet (Baba, 1988). Unverändert zeigte sich die FSH-Produktion nach 10-20wöchiger Gabe einer Dosis von 2,5-3,0 mg/kg/d (Weinbauer et al., 1983). Bei einer Gruppe von 18 Arbeitern einer Batteriefabrik in Italien mit signifikant erniedrigten Spermienzahlen (45 versus 73×10^6 per ml in der Kontrollgruppe) wurde über unveränderte Spiegel an FSH, Testosteron, LH und Prolaktin berichtet (Assennato et al., 1986). Außerdem konnte in einer in vivo Studie (Bleiazetat, 1%ige Lsg., 10 Wochen, erwachsene Tiere) keine Veränderung des Inhibin-Spiegels in der Tubulusflüssigkeit und der interstitiellen Flüssigkeit festgestellt werden (Nathan et al., 1992). Bei der in vitro Testung der bekannten testikulären Noxen meta-Dinitrobenzol (mDNB) und Nitrobenzol (NB) zeigte sich nur eine geringe oder gar keine Beeinflussung der Inhibinsekretion, wobei die Ergebnisse stark von den in vivo Ergebnissen abwichen (Allenby et al., 1990; Allenby et al., 1991; Maddocks et al., 1992). Die älteren unter den angeführten Studien wurden jedoch mit einem Inhibin RIA (Radioimmunoassay) durchgeführt, der nicht hinreichend den bei Männern physiologischen Inhibin-B vom irrelevanten Inhibin-A unterscheiden kann, sondern beide Formen mißt. Bei neueren Arbeiten, so auch bei der vorliegenden Dissertation, wurde schon mit dem ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) gemessen, der nur die physiologisch aktive Form bestimmt und daher genaue Aussagen macht. Eine Schädigung des Reproduktionsapparates durch Suppression der FSH-Sekretion oder Anstieg der Inhibinsekretion und damit verbundener Abnahme der Sertoli-Zellaktivität erscheint jedoch möglich.

Bei Daidzein und Östradiol zeigten sich im Konzentrationsbereich von 0 -10 000 ng/ml (0-36 μ M) bzw. 0-1000 ng/ml (0-3,6 μ M) nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden keine signifikanten Veränderungen der Inhibin-B-Produktion der Sertoli-Zellen. Allerdings ist bei Östradiol ein Trend zu geringeren Inhibin-B-Werten zu erkennen (Abb. 21). Dagegen fiel die Inhibin-B-Produktion ab 10000 ng/ml Bisphenol-A um 25% gegenüber der Kontrolle ab (Abb. 18). Genau das Gegenteil bewirkte die Inkubation mit 17α -Ethinylöstradiol. Ab Konzentrationen von 100-1000 ng/ml (0,33-3,3 μ M) Ethinylestradiol kam es zu einem signifikanten Anstieg der Inhibin-B-Konzentration um 43% (Abb. 20).

In der vorliegenden Studie zeigte sich in den niedrigen Konzentrationsbereichen (0,1-10 ng/ml) der Östrogene und Xenoöstrogene kein Einfluss auf die Inhibin-B-Produktion der Sertoli-Zellen. Ethinylöstradiol führte jedoch ab einer Konzentration von 100 ng/ml (0,33 μ M) zu einem signifikanten Anstieg der Inhibin-Produktion der Sertoli-Zellen, also erst im höheren Konzentrationsbereich. Ethinylöstradiol ist heute in fast allen, auf dem Markt erhältlichen Ovulationshemmern, in Konzentrationen von 30-50 μ g enthalten. Deshalb kann man auch davon ausgehen, dass die Umwelt kontaminiert wird, und so möglicherweise auch die Inhibin- bzw. die Laktatproduktion der Sertoli-Zellen beim Mann beeinflusst werden könnte (Rurainski et al., 1977; Kalbfus, 1998).

Berlau et al. (2000) überprüfte die basale sowie die FSH-stimulierte Sekretion von Inhibin-B bei Sertoli-Zellen. Hier fand sich im Konzentrationsbereich von 0,1 nM bis 1000 nM 17 β -Östradiol ebenfalls kein Einfluss. Auch in älteren Berichten von Bicsak et al. (1987) und Morris et al. (1988) übte 17 β -Östradiol keinen Einfluss auf die Inhibin-Sekretion von Sertoli-Zellen aus. Jedoch zeigen physiologische Konzentrationen von 17 β -Östradiol (0,01-0,1 ng/ml) nach 24 und 48 Stunden eine Steigerung der Inhibin-B Produktion bei Sertoli-Zellen (Depuydt et al., 1999). Diese Ergebnisse konnten aber weder von uns (Monsees et al., 2000) noch von Berlau et al., (2000) reproduziert werden.

Im wesentlichen stimmen die Aussagen aber überein: im niedrigen Konzentrationsbereich hatten die getesteten Substanzen keinen Einfluss auf die Inhibin-B-Sekretion der Sertoli-Zellen. Demnach eignet sich die Messung der Inhibin-B Sekretion der Sertoli-Zellen prinzipiell für den Nachweis eines schädigenden Einflusses von Substanzen. Testosteron, ein weiterer Einflussfaktor, kann die Produktion von Inhibin-B beeinflussen. Es wurde sowohl stimulierender, inhibierender als auch gar kein Einfluss beschrieben (Berlau et al., 2000). Im vorliegenden Projekt wurde deshalb während der Inkubationszeit der Östrogene und Xenoöstrogene ein Zellkulturmedium ohne Testosteron verwendet.

Bei den Nitromoschusduftstoffen kam es erst im hohen Konzentrationsbereich zu einer leichten Abnahme der Inhibinproduktion der Sertoli-Zellen, welche auch, durch den oben genannten Abbau der Nitroaromaten, bedingt sein könnte (Siol, 2002). Die entstehenden Amino-Metabolite zeigen östrogenartige Wirkungen (Chou und Dietrich, 1999a,b; Christian et al., 1999; Siol, 2002). Moschus Xylol führte bei einer Konzentration von 1000 ng/ml (3,3 μ M) zu einer signifikanten Verringerung der Inhibinproduktion der Sertoli-Zellen (Abb. 23).

Eine Bindung an Östrogenrezeptoren ist prinzipiell möglich, da Sertoli-Zellen diese aufweisen (Sharpe, 2003). So ist der Einfluss, z.B. von östrogen- oder antiandrogen wirkenden Substanzen, wahrscheinlich die Ursache für den Maleszensus des Hodens (Testiculär-Dysgenesis syndrom) (Sharpe und Skakkebaek, 1993; Sharpe, 2003). Verschiedene Chemikalien, eingeschlossen Pestizide und Phthalatester, beinhalten Östrogene und Antiandrogene in niedrigen Dosierungen (Sharpe, 2003). Allerdings gibt es zur Zeit noch wenig Beweise, die die Zunahme der männlichen urogenitalen Fehlbildungen durch die Einwirkung von östrogenhaligen Substanzen unterstützen. Im Hinblick auf diese Hypothesen (Sharpe, 2003) zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass erst bei höheren Konzentrationen (im Mikromolaren Bereich) der einzelnen Noxen Effekte in der Laktat- oder Inhibinproduktion zu verzeichnen sind bei unveränderter Vitalität der Sertoli-Zellen. Dies unterstützt die Aussagen von Sharpe et al. dahingehend, dass bestimmte Noxen (z.B. Ethinylöstradiol) Einfluss auf Funktionsparameter der Sertoli-Zelle und damit auf die Fertilität haben können. Wahrscheinlich kann man von verschiedenen Wirkmechanismen ausgehen, z.B. Enzym- oder Rezeptor gesteuerter Wirkmechanismus. So könnten z.B. durch Xenoöstrogene (Bisphenol-A) in höheren Konzentrationen Enzyme gehemmt werden, die für die Synthese oder Aktivität des Laktats oder des Inhibin-B ausschlaggebend sind. Dieser Zusammenhang wurde bereits bei der Inhibition der Steroidogenese der Leydig- Zellen gezeigt (Brinkmann et al., 1980; Moger, 1980). Weiterhin könnten die Xenoöstrogene in Wechselwirkung mit dem FSH-Rezeptor der Sertoli-Zelle stehen. Auch die Synthese und Sekretion von Inhibin-B aus den Sertoli-Zellen wird durch FSH stimuliert (Anderson und Sharpe, 2000).

Als Fazit dieser Arbeit kann gesagt werden, dass mit den hier gemessenen Parametern Vitalität, Laktat und Inhibin-B ein reproduktionstoxikologisches Potential von Ethinylöstradiol festzustellen war, welches mit zunehmender Konzentration zu einem signifikantem Anstieg der Laktat- und Inhibinsekretion führte, wobei sicherlich unterschiedliche Wirkmechanismen eine Rolle spielen.

Weiterhin konnte festgestellt werden, dass die Nitroaromaten Moschus-Keton und Moschus-Xylol (Muttersubstanzen), wahrscheinlich über deren Aminometaboliten, einen Einfluss auf die Laktat- und Inhibinproduktion der Sertoli-Zellen haben. Sertoli-Zellen können demnach diese Metabolite produzieren, so dass prinzipiell eine hormonelle Wirkung auftreten könnte.

6 Zusammenfassung

Als Ursache für den beobachteten Rückgang in der Anzahl der Spermatozoen wird eine Belastung des Mannes, vor allem durch Umweltschadstoffe, diskutiert. Es kam allein in den letzten Jahren gerade in den Industrienationen zu einem Anstieg der Zahl infertiler Paare. Eine Beeinträchtigung der Morphologie oder Physiologie der Sertoli-Zellen könnte dafür verantwortlich sein, da diese eine elementare Funktion in der Spermatogenese ausüben. Umweltschadstoffe, wie z.B. Moschus Keton oder Moschus Xylol, die breite Anwendung in der Kosmetikindustrie finden, oder auch die Xenoöstrogene Bisphenol-A, Ethinylöstradiol und Daidzein, scheinen dabei eine Rolle zu spielen.

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung und Evaluierung eines Testmodells, das die Auswirkungen von Nitromoschusduftstoffen (Moschus Keton, Moschus Xylol), Xenoöstrogenen (Bisphenol-A, 17α -Ethinylöstradiol, Daidzein) und 17β -Östradiol auf die biochemischen Leistungen und die Vitalität von Sertoli-Zellen untersucht.

Zu den biochemischen Parametern, die überprüft wurden, gehörte die Sekretion des Kohlenhydrats Laktat und die Sekretion des Hormons Inhibin-B. Die Versuche wurden an Sertoli-Zellmonokulturen durchgeführt, die vorher aus dem Hoden etwa 21 Tage alter Sprague-Dawley-Ratten isoliert worden waren. Die Substanzen wurden dazu in fünf Konzentrationen in Medium gelöst und die Zellen dann für 24 h und 48h (Inhibin) bzw. 48h und 72h (Laktat, Vitalität) inkubiert. Danach wurde der Proteingehalt mit der Methode nach Lowry et al. und die Vitalität der Zellen mit dem MTT-Assay untersucht. Die Laktatproduktion wurde als metabolischer und die Inhibinproduktion als endokriner Parameter bestimmt. Dazu wurde zum einen ein gekoppelter Enzym-Assay und zum anderen ein ELISA verwendet.

Außer bei Ethinylöstradiol konnte bei keinem der untersuchten Xenoöstrogene und Nitromoschusverbindungen eine signifikante Veränderung der sekretorischen Sertoli-Zell-Parameter festgestellt werden.

Bis zu einer Konzentration von 10 ng/ml kam es auch bei Ethinylöstradiol zu keiner signifikanten Veränderung der sekretorischen Parameter. Ab Konzentrationen von 10 bzw. 100 ng/ml (0,03/0,33 μ M) Ethinylöstradiol kam es zu einer signifikanten Erhöhung der Laktat- und Inhibin-B-Produktion der Sertoli-Zellen. Unter den Nitromoschusverbindungen zeigte nur Moschus Xylol einen Trend zu konzentrationsabhängig leicht ansteigenden Werten in der Laktatproduktion der Sertoli-Zellen. Moschusketon führte sogar zu einem

geringfügigen Abfall der Laktatwerte, dagegen fielen unter Moschus Xylol die Inhibinwerte geringfügig ab.

Bei Daidzein fiel auf, dass es bei einer Konzentration von 10000 ng/ml (36 μ M) zu einer Abnahme der Vitalität kam und in diesem Konzentrationsbereich auch die Laktatproduktion der Sertoli-Zellen abfiel. Die Inhibinkonzentration zeigte bei Konzentrationen von 1-10000 ng/ml (0,036-36 μ M) Daidzein keine Veränderungen. Bisphenol-A führte zu einer Senkung der Inhibinproduktion der Sertoli-Zellen im Konzentrationsbereich 10000 ng/ml (43,85 μ M) bei gleichbleibender Vitalität der Sertoli-Zellen. Das natürliche Östradiol zeigte dagegen überhaupt keinen Einfluss auf die sekretorischen Parameter der Sertoli-Zellen im Konzentrationsbereich von 0,1-1000 ng/ml (0-3,6 μ M).

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit geht hervor, dass sich die Änderungen in Laktat- und Inhibin-Produktion und auch der Vitalität erst nach Gabe höherer Konzentrationen, vor allem mikromolare Konzentrationen, der verwendeten Noxen zeigen, welches daher nicht mit einem Östrogen-Rezeptor vermittelten Mechanismus zu begründen ist. Hier treten eher direkte hemmende Einflüsse auf Enzyme auf, die bei dem Stoffwechsel von Laktat sowie Inhibin eine Rolle spielen. Solche Änderungen in der Physiologie der Sertoli-Zelle könnten schließlich auch zu einer gestörten Spermatogenese führen.

Die Interpretation der Daten gestaltet sich jedoch schwierig im Hinblick auf die zellulären Angriffspunkte der unterschiedlichen Substanzen. Von dem natürlichen Östradiol ist bekannt, dass es über Östrogen-Rezeptoren an der Sertoli-Zelle wirkt. Es gibt aber noch viele andere Wirkmechanismen, über die die Sertoli-Zelle in Hinblick auf die Laktat und Inhibin-Produktion beeinflusst werden kann. Einige Mechanismen wurden in dieser Arbeit vorgestellt.

Trotzdem lassen die Laktat- und Inhibin-Bestimmung in Zusammenhang mit den Vitalitätswerten eine valide Aussage über die toxische Potenz einer Substanz in Bezug auf die Sertoli-Zelle zu. Der sensitivste Parameter scheint dabei die Inhibin-B-Sekretion zu sein.

Die Etablierung des Testsystems konnte somit erfolgreich durchgeführt werden. Praxistauglichkeit und Zeitaufwand hielten sich im Rahmen der anfänglichen Zielformulierung.

7 Literaturverzeichnis

- Adami H, Berstrom, R, Mohner M, Zatonski W, Storm H, Ekborn A, Tretli S, Teppo L, Ziegler H, Rahu M (1994) Testicular cancer in nine northern European countries. *International Journal of Cancer* 59: 33-38.
- Aitken & Sawyer (2003) The human spermatozoon-not waving but drowning. *Adv. Exp Med Biol* 518: 85-98
- Allenby G, Sharpe RM, Foster PMD (1990) Changes in Sertoli cell function in vivo induced by nitrobenzene. *Fundam Appl Toxicol* 14: 364-375
- Allenby G, Foster PM, Sharpe RM (1991) Evaluation of changes in the secretion of immunoactive Inhibin by adult rat seminiferous tubules in vitro as an indicator of early toxicant action on spermatogenesis. *Fundam Appl Toxicol* 16(4): 710-724
- Anderson D, Dobrzynska MM, Yu TW, Gandini L, Cordelli E, Spano M (1997) DNA integrità in human sperm. *Teratog Carcinog Mutagen* 17: 97-102
- Anderson RA, Sharpe RM (2000) Regulation of inhibin production in the human male and its clinical applications. *Int J Androl* 23: 136-144
- Anthony A, Caldwell J, Hult AJ, Smith RL (1987) Metabolism of estragole in rat and mouse and influence of dose size on excretion of the proximate carcinogen 1'-hydroxyestragole. *Food chem.. Toxicol* 25: 799-806
- Anthony MS, Clarkson TB, Hughes CL, Morgen TM, Burke GL (1996) Soybean isoflavones improve cardiovascular risk factors without affecting the reproductive system of peripubertal rhesus monkeys. *J Nutr* 126: 43-50.
- Assennato G, Claudio P, Molinini R, Candela RG, Baser ME, Altamura BM, Giorgino R (1986) Sperm count Suppression without endocrine dysfunction in lead exposed men. *Arch Environ Health* 41: 387-390
- Baba Y (1988) Effect of HCG administration in the gossypol treated male rats. *Hinyokika-Kiyo* 34: 643-647
- Bannwart C, Fotsis T, Heikkinen R, Adlercreutz H (1984) Identification of the isoflavonic phytoestrogen daidzein in human urine. *Clin Chim Acta* 136: 165-172
- Berlau J, Roemer W, Oettel M, Hipler UC, Patchev V, Schreiber G (2000) 17 α -oestradiol and 17 β -oestradiol do not affect basal and follicle-stimulating hormone-stimulated inhibin B secretion by highly purified rat Sertoli cells. *Andrologia* 32: 345-349
- Bicsak TA, Vale W, Vaughan J, Tucker EM, Cappel S, Hsueh AJ (1987) Hormonal regulation of inhibin production by cultured sertoli cells. *Mol Cell Endocrinol* 49: 211-217

- Boekelheide K (1993) Sertoli cell toxicants. In: The Sertoli Cell, Russell LD, Griswold MD (Hrsg.), Cache River Press, Clearwater FL, USA, pp 551-575
- Brinkmann AO, Leemborg FG, Roodnat EM, De Jong FH, Van der Molen HJ (1980) A specific action of estradiol on enzymes involved testicular steroidogenesis. *Biol Reprod* 23: 801-809
- Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaeck N (1992) Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *Br Med J* 305: 609-613.
- Carreau S (1995) Human Sertoli cells produce inhibin in vitro: an additional marker to assess the seminiferous epithelium development. *Hum Reprod* 10: 1947-1949
- Carreau S, Drosowsky MA, Foucault P (1996) Enzymatic properties of adult human Sertoli cells in vitro. *Andrologia* 28: 91-97.
- Carreau S, Bourguiba S, Lambard S, Galeraud-Denis I, Genissel C, Levallet J (2002) Reproductive system: aromatase and estrogens. *Mol cell Endocrinol* 193: 137-143
- Chapin RE, Gray TJB, Phelps JL, Dutton SL (1988) The effects of mono- (2 – ethylhexyl)-phtalate on rat Sertoli cell-enriched primary cultures *Toxicol Appl Pharmacol* 92: 467-479.
- Chou Y, Dietrich D (1999a) Interactions of nitromusk parent compounds and their amino-metabolites with the estrogen receptors of rainbow trout and the South African clawed frog. *Toxicol. Lett.* 111: 27-36 (1)
- Chou Y, Dietrich D (1999b) Toxicity of nitromusks in early lifestages of South African clawed frog and zebrafish. *Toxicol. Lett.* 111: 17-25 (2)
- Christian M, Parker R, Hobermann A, Diener R, Api A M (1999) Developmental toxicity studies of four fragrances in rats. *Toxicol. Lett.* 111: 169-174
- Colborn T (1995) Pesticides – how research has succeeded and failed to translate science into policy: endocrinological effects on wildlife. *Environm Health Perspect* 103 (Suppl 6): 81-86
- Copeland PA, Sumpter JP, Walker JP, Croft M (1986) Vitellogenin levels in male and female rainbow trout (*salmo gairdnerii*) at various stages of the reproductive cycle. *Comp Biochem Physiol*, 83B: 487-493
- Corrier DE, Mollenhauer HH, Clark DE, Hare MF, Elissalde MH (1985) Testikular degeneration and necrosis induced by dietary cobalt. *Vet Pathol* 22 (6): 610-616
- De Krester DM, Robertson DM (1989) The isolation and physiology of inhibin and related proteins. *Biol Reprod* 14: 239-60
- De Krester DM, McFarlane JR (1996) Inhibin in the Male. *Journal of Andrology* 17 (3): 179-182

- Depuydt CE, Mahmoud AM, Dhooge WS, Schoonjans FA, Comhaire FH (1999) hormonal regulation of inhibin B secretion by immature rat sertoli cells in vitro. *J.Androl.* 20 (1): 54-62
- Deutsche Forschungsgemeinschaft. Hormonally active agents in food. Symposium, DFG-Senatskommission zur Beurteilung von Lebensmitteln. Wiley VCH, Weinheim, 1998
- Eaton M, Schenker M, Whorton MD, Samuels S, Perkins C, Overstreet J (1986) Seven-years follow-up of workers exposed to 1,2-dibromo-3-chloropropane. *J Occupat Med* 28(11): 1145-1150.
- Eramaa M, Heikinheimo K, Voutilainen R (1992) Developmental and cyclic adenosine 3', 5' monophosphate-dependent regulation of inhibin subunit messenger ribonucleic acids in human fetal testis. *J Clin Endocrinol Metab* 75 (3): 806-811.
- Facemire CE, Gross TS, Guilett LJ jr (1995) Reproductive impairment in the Florida panther: nature or nurture ? *Environm Health Perspect* 103 (Suppl 4): 79-86.
- Fakunding JL, Tindall DJ, Dedman JR, Mena CR, Means AR (1976) Biochemical actions of follicle stimulating hormone in the Sertoli cell of the rat testis. *Endocrinology* 98: 392-402.
- Field M, Block JB, Leven R, Rall DR (1966) Significance of blood lactate elevations among patients with acute leukaemia and other neoplastic proliferative disorders. *Am J Med* 40: 528
- Fisher JS, Turner KJ, Brown D, Sharpe RM (1999) Effects of neonatal exposure to estrogenic compounds on development of the excurrent ducts of the rat testis through puberty to adulthood. *Environ Health Perspect.* 107: 397-405
- Fooker C, Gühr R, Häckl M, Seel P (1997) Orientierenden Messungen gefährlicher Stoffe – Landesweite Untersuchungen auf organische Spurenverunreinigungen in hessischen Fließgewässern, Abwässern und Klärschlämmen, 1991-1996. Umweltplanung, Arbeits- und Umweltschutz, Heft 233 der Hessischen Landesanstalt für Umwelt, Wiesbaden, S. 89-96
- Foucault P, Drosowsky MA, Carreau S (1994) germ cell and Sertoli cell interactions in human testis: evidence for stimulatory and inhibitory effects. *Human Reproduction* 9 (11): 2062-2068
- Fritz IB, Kopec B, Lam K, Vernon RG (1974) Effects of FSH on levels of androgen binding proteins in the testis. In: *Hormone Binding and Target Cell Activation in the Testis*, eds. ML Dufau and AR Means, 311-327. Plenum, New York.
- Frommer JP (1983) Lactic Acidosis, symposium on Acid Base Disorders. *Medical Clinics of North America* 67: 815-828

- Gaesser GA, Brooks GA (1984) Metabolic bases of excess post-exercise oxygen consumption. A review. *Med Sci Sports Exerc* 16: 29-43
- Galdieri M, Ziparo E, Palombi F, Russo MA, Stefani M (1981) Pure Sertoli cell cultures: a new model for the study of somatic-germ cell interactions. *J Androl* 5: 249-254
- Gatermann R et al. (1999) Polycyclic and nitro musks in the environment: A comparison between Canadian and European aquatic biota. *Chemosphere* 38: 3431-3441
- Gloster JA, Harris P (1962) Observations on an enzymatic method for the estimation of pyrovate in blood. *Clin Chim Acta* 7: 206
- Goodman JI, Ward JM, Popp JA, Klannig JE, Fox TR (1991) Mouse liver carcinogenesis: mechanisms and relevance. *Fundam Appl Toxicol* 17: 651-665
- Haaster LH, van, de Jong FH, Docter R, de Rooij DG (1992) The effect of hypothyroidism on Sertoli cell proliferation and hormone levels during testicular development in the rat. *Endocrinology* 131: 1574-1576.
- Hadley MA, Byers SW, Suarez-Quian CA, Kleinmann HK, Dym MC (1985) Extracellular matrix regulates Sertoli cell differentiation, testicular cord formation, and germ cell development in vitro. *J Cell Biol* 101: 1511-1522
- Hardin BD, Bond GP, Sikov MR, Andrew FD, Beliles RP, Niemeier RW (1981) Testing of selected workplace chemicals for tratogenic potential. *Scand J Work Environ Health* 7 Suppl 466-475
- Hawkins D R, Ford R A (1999) Dermal absorption and disposition of Musk Ambrette, Musk Ketonen and Musk Xylene in rats. *Toxicol.Lett.* 111: 95-103
- Heberer T, Gramer S, Stan H J (1999) Occurence and distribution of organic contaminants in the aquatic system in Berlin. Part. III: Determination of synthetic musks in Berlin surface water applying solid-phase microextraction (SPME) and GC-MS. *Acta hydrochim. hydrobiol.* 27: 150-156
- Hinton BT, Setchell BP (1993) Fluid secretion and movement. In: Russel LD, Griswold MD (eds) *The sertoli cell*. Cache River Press, Clearwater, USA pp 249-267
- Hiort O (2002) Präinatale Entwicklung der Gonaden und deren Störungen. *Perinatale Endokrinologie, normale Entwicklung und Störungen der hormonellen Regulation vor und nach der Geburt*, Palatium Verlag, Edition J&J, Mannheim, 1. Auflage 2002, S. 121-128
- Hoffmann WH, Kovacs KT, Gala RR, Keel BA, Jarrell TS, Ellegood JO, Burek CL (1991) Macroorchidism and testicular fibrosis associated with autoimmune thyroiditis. *J Clin Invest* 14: 609-616.

- Hughes PJ, McClellan H, Lowes DA, Kahn SZ, Bilmen JG, Tovey SC, Godfrey RE, Michell RH, Kirk CJ, Michelangeli F (2000) Estrogenic alkylphenols induce cell death by inhibiting testis endoplasmatic reticulum Ca^{2+} pumps. *Biochem Biophys Res Commun* 277: 568-574
- Illingworth PJ, Groome NP, Byrd W, Rainey WE, Mc Neilly AS, Mather JP, Bremner WJ (1996) Inhibin-B: A likely candidate for the physiologically important form of inhibin in men. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 81 (4): 1321-1325
- Janecki AJ, Jakubowiak A, Steinberger A (1992) Effect of cadmium chloride on transepithelial electrical resistance of Sertoli cell monolayers in two-compartment cultures – A new model for toxicological investigations of the “blood-testis” barrier in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol* 112: 51-57
- Johnson L, Chaturvedi PK, Williams JD (1992) Missing generations of spermatocytes and spermatids in seminiferous epithelium contribute to low efficiency of spermatogenesis in humans. *Biol Reprod* 47: 1091-1098
- Jones HB, Garside DA, Liu R, Roberts JC (1993). The influence of phthalate esters on Leydig cell structure in vitro and in vivo. *Exp Mol Pathol* 57: 179-183
- Jutte NH, Jansen R, Grootegoed JA, Rommerts FFG, Van der Molen HJ (1981) Exogenous lactate is essential for metabolic activities in isolated rat spermatocytes and spermatids. *J Reprod Fertil* 62: 399-405.
- Käfferlein H, Angerer J (2000) Zur Frage der Kanzerogenität und Kogentoxizität von Moschus Xylol und Moschus Keton. *Umweltmed. Forsch. Prax.* 5: 22-26
- Kainz V, Frick J, Kainz P, Kalla NR (1988) The effect of gossypol acetic acid on the different stages of spermatogenetic cycle in the rat. *Intern J Androl* 11: 533-546
- Kalbfus W (1998) Hormonaktive Substanzen in (bayrischen) Gewässern – Herkunft und Gefährdungspotential. In: GSF-Bericht 16/98, p. 25-30
- Kelly CW, Janecki A, Steinberger A, Russel LD (1991) Structural characteristics of immature rat Sertoli cells in vivo and in vitro. *Am J Anat* 192: 183-193
- Korach KS, Sarver P, Chae K, McLachlan JA, McKinney JD (1988) Estrogen receptorbinding activity of polychlorinated hydroxybiphenyls: conformationally restricted structural probes. *Molec Pharmacol* 33: 120-126
- Krass J (1997) 2,4,6-Trinitrotoluol und relevante Metabolite: Untersuchungen zu chemischen Eigenschaften und biologischen Wirkungen unter besonderer Berücksichtigung des Mediums Boden. Dissertation Universität Bremen

- Lacroix M, Smith FE, Fritz IB (1977) Secretion of plasminogen activator by Sertoli cell enriched cultures. *Mol Cell Endocrinol* 9: 227-236.
- Liebl B, Ehrenstorfer S (1993) Nitro-musk compounds in breast milk. *Gesundheitswesen*. 55(10): 527-32
- Liebl B, Mayer R, Ommer S, Sönnichsen C, Koletzko B (2000) Transition of nitro musks and polycyclic musks into human milk. Chap. 26 in: Short and long term effects of breast feeding on child health Ed. B.Koletzko et al., Kluwer Academic/Plenum Press
- Lindstrom P, Harris M, Ross M, Lamb JC, Chapin Re (1988). Comparison of changes in serum androgen binding protein with germinal epithel damage and infertility induced by di-n-pentyl phthalate. *Fund Appl Toxicol* 11: 528-539
- Ling N, Ying SY, Ueno N, Shimasaki S, Esch F, Hotta M, Guillemin R (1986) Pituitary FSH is released by a heterodimer of the beta – subunits from the two forms of inhibin. *Nature* 321 (6072): 779-782
- Loomis ME (1961) An enzymatic fluorometric method for the determination of lactic acid in serum. *J Lab Clin Med* 57: 966
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J Biol Chem* 193: 265-267
- Maddocks S, Kerr JB, Acllenby G, Sharpe RM (1992) Evaluation of the role of germ cells in regulating the route of secretion of immunoactive Inhibin from the rat testis. *J Endocrinol* 132 (3): 439-448
- Mather JP, Woodruff TK, Krummen LA (1992) Paracrine regulation of reproductive function by inhibin and activin. *Proc Soc Exp Biol Med* 201 (1): 1-15
- Marbach EP, Weil MH (1967) Rapid enzymatic measurement of blood lactate and pyruvate. *Clin Chem* 13: 314
- McLachlan RI, Dahl KD, Bremner WJ, Schwall R, Schmelzer CH, Mason AJ, Steiner RA (1989) Recombinant human activin – A stimulates basal FSH and GnRH – stimulated FSH and LH release in the adult male macaque, *Macaca fascicularis*. *Endocrinology* 125 (5): 2787-2789.
- Miller GE, Welsh MJ, Brabec MJ (1985) Alteration in lactate metabolism in Sertoli cells and spermatocytes by 1,2-dibromo-3-chloropropane. *Toxicologist* 5: 120.
- Moger WH (1980) Direct effects of estrogens on the endocrine function of the mammalian testis. *Can J Physiol Pharmacol* 58: 1011-1022
- Monsees TK, Miska W, Schill WB (1996) Enzymic digestion of bradykinin by rat sertoli cell cultures. *J Androl* 17: 375-381

- Monsees TK, Winterstein U, Schill WB (1998a) Influence of gossypol on the secretory function of cultured Sertoli cells. *Toxicol* 36: 813-816
- Monsees TK, Winterstein U, Hayatpour J, Schill WB, Miska W (1998b). Effect of heavy metals on the secretory function of testicular cells in culture. *J Trace Microprobe Techn* 16 : 427-435
- Monsees TK, Franz M, Gebhardt S, Winterstein U, Schill WB, Hayatpour J (2000) Sertoli cells as a target for reproductive hazards. *Andrologia* 32: 239-246
- Morris PL, Vale WW, Cappel S, Bardin CW (1988) Inhibin production by primary Sertoli cell-enriched cultures: regulation by follicle-stimulating hormone, androgens and epidermal growth factor. *Endocrinology* 122: 717-725
- Moss EJ, Cook MW, Thomas LV, Gray TJB (1988) The effect of mono-(2-ethylhexyl) phthalate and other phthalate esters on lactate production by Sertolicells in vitro. *Toxicol Lett* 40: 77-84.
- Moore A, Lynne A, Krummen Mather J (1993) Inhibins, activins, their binding proteins and receptors: interactions underlying paracrine activity in the testis. *Molecular and Cellular Endocrinology* 100: 81-86.
- Nathan E, Huang HF, Pogach L, Giglio W, Bogden JD, Seebode J (1992) Lead acetate does not impair secretion of Sertoli cell function marker proteins in the adult Square Dawley rat. *Arch Environ Health* 47 (5): 370-375
- Nieschlag, E (2000) Aufgaben und Ziele der Andrologie
In: Nieschlag, F & Behre, HM (Hrsg) *Andrologie Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes*. 2. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1-9
- Niwa T, Tsutsui M, Kishimoto K, Yabusaki Y, Ishibashi F, Katagiri M (2000) Inhibition of drug-metabolizing enzyme activity in human hepatic cytochrome P450s by bisphenol A. *Biol Pharm bull* 23: 498-501.
- Noll FL (1984) (+) Lactate. In: Bergmeyer HU (ed.). *Methods of enzymatic analysis*. Academic Press, New York: 582-588
- Nolte T, Harleman JH, Jahn W (1994) Histopathology of chemically induced testicular atrophy in rats. *Exp Toxic Pathol* 47: 267-286.
- Onoda M, Suarez-Quian CA, Dym M (1990) Characterization of Sertoli cells cultured in the bicameral chamber system: relationship between formation of permeability barriers and polarized secretion of transferrin. *Biol. Reprod* 43: 672-68

- Pelletier RM, Byers SW (1992) The blood testis barrier and Sertoli cell junctions: structural considerations. *Microsc Res Tech* 20: 3-33
- Pont J, Albrecht W (1997) Fertility after chemotherapy for testicular germ cell cancer. *Fertil steril.* 68: 1-5
- Raychoudhury SS, Flowers AF, Milette CF, Finlay MF (2000) Toxic effects of polychlorinated biphenyls on cultured rat Sertoli cells. *J Androl* 21: 964-973
- Reader SCJ, Foster PMD (1990) The in vitro effects of four isomers of dinitotoluene on rat Sertoli and Sertoli-germ cell cocultures: germ cell detachment and lactate and pyruvate production. *Toxicol Appl pharmacol* 106: 287-294
- Rimkus G, Brunn H (1996) Synthetische Moschusduftstoffe- Anwendung, Anreicherung und Toxikologie. *Ernährungs Umschau* 43: 156-164
- Rimkus G, Gattermann R, Hühnerfuss H (1999) Musk Xylene and Musk Ketone amino metabolites in the aquatic environment. *Toxicol. Lett.* 111: 5-15
- Rivier C, Cajander S, Vaughan J, Hsueh AJW (1988) Age dependent changes in physiological action, content and immunostaining of inhibin in male rats. *Endocrinology* 123: 120-126
- Robertson DM, Risbridger GP, de Krester DM (1993) Inhibin and inhibin-related proteins. In: Desjardins C, Ewing LL (eds) *Cell and molecular biology of the testes*. Oxford UnivPress, New York Oxford, pp 220-237
- Robinson R, Fritz IB (1981) Metabolism of glucose by sertoli cells in culture. *Biol Reprod* 24: 1032-1041
- Rurainski RD, Theiss HJ, Zimmermann W (1977) Über das Vorkommen von natürlichen und synthetischen Östrogenen in Trinkwasser. *Gwf-Wasser/Abwasser* 118: 287-91.
- Schäfer WR, Zahradnik HP, Frijus-Plessen N, Schneider K (1996) Anthropogene, Substanzen mit unerwünschter Estrogenwirkung. *Umweltmedizin* 1: 35-42
- Schlatt S, Weinbauer GF, Arslan M, Nieschlag E (1995) Endocrine control of testicular somatic and premeiotic germ cell development in the immature testis of the primate *Macaca mulatta*. *Eur J Endocrinol* 133: 235-247.
- Schuurs AH (1999) Reproductive toxicity of occupational mercury. *J Dent.* 27: 249-256
- Sharpe RM, Skakkebaek NE (1993) Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet* 341: 1392-5.
- Sharpe R (1994) Regulation of spermatogenesis. In: Knobil E, Neill JD (eds) *The physiology of reproduction*. Raven Press, New York, pp 1363-1434

- Sharpe RM, Fisher JS, Millar MM, Jobling S, Sumpter JP (1995) Gestational and lactational exposure to xenoestrogens results in reduced testicular size and sperm production. *Environ Health Perspect.* 103: 1136-43
- Sharpe RM (2003) The oestrogen hypothesis-where do we stand now? *Int. J Androl.* 26: 2-15
- Siol A (2002) Synthetische Moschusduftstoffe: eine multidimensionale Bewertung ihres Risikos für die Umwelt am Beispiel ausgewählter Leitchemikalien:77. Dissertation Universität Bremen
- Skakkebaek NE (1995) Male reproductive health and environmental chemicals with estrogenic effects. Danish Environmental Protection agency, Miljøprojekt nr. 290/1995. Ministry of Environment and Energy, Denmark.
- Skinner MK, Griswold MD (1980) Sertoli cell synthesis and secrete transferring- like protein. *J Biol Chem* 255: 9523-9525.
- Stachel B, Dougherty RC, Lahl U, Schlösser M, Zeschmar B (1989) Toxic environmental chemicals in human semen: Analytical method and case studies. *Andrologia* 21 (3):282-291
- Steinberger A, Hintz M, Heindel JJ (1978) Changes in cyclic AMP responses to FSH in isolated rat Sertoli cells during sexual maturation. *Biol Reprod* 19: 566-572.
- Sylvester SR, Griswold MD (1995) The testicular iron shuttle: A “ nurse “ function of the Sertoli cells. *J Androl* 15: 381-383.
- Thiagaraj D, Gunasegaram R, Loganath A, Peh KL, Kottegoda SR, Ratnam SS (1987) Histopathology of the testes from male transsexuals on estrogen therapy. *Ann Acad Med Singapore* 16: 347-348
- Thierfelder W (1995) Hormone in der Umwelt – das Ende der Männlichkeit? *Bundesgesundhbl.* 9/95
- Toppari J, Larsen JC, Christiansen P, Giwercman A, Grandjean P, Guillette LJ JR, Jegou B, Jensen TK, Jouannet P, Keiding N, Leffers H, McLachlan JA, Meyer O, Muller J, Rajpert De Meyts E, Scheike T, Sharpe R, Sumpter J, Skakkebaek NE (1996) Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environ Health Perspect* 104 (Suppl 4): 741-757
- UBA-Pressemitteilung Nr. 14 (2000) Duft- und Aromastoffe nicht unüberlegt in Innenräumen einsetzen
- Vom Saal FS, Cooke PS, Buchmanan DL, Palanza P, Thayer KA, Nagel SC, Parmigiani S, Welshons WV (1998) A physiologically based approach to the study of bisphenol-a and other estrogenic chemicals on size of reproductive organs, daily sperm productions, and behavior. *Toxicol Indust Health* 14: 239-260

- Waites GMH, Gladwell RT (1982) Physiological significance of fluid secretion in the testis and blood – testis barrier. *Physiol Rev* 62: 624-671.
- Weinbauer GF, Rován E, Frick J, Adam H (1983) The endocrine status of gossypol-treated male rats. *Andrologia* 15: 565-570
- Weinbauer GF, Nieschlag E (1992) LH-RH antagonists: state of the art and future perspectives. In: Höffken K (ed) *Peptides in oncology*. Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo, pp 113-136
- Weinbauer GF, Nieschlag E (1993) Hormonal control of spermatogenesis. In: de Kretser DM (ed) *Molecular biology of the male reproductive system*. Academic Press, San Diego New York, pp 99-142
- Welsh MJ, Wiebe JP (1975) Rat Sertoli cells: a rapid method for obtaining viable cells. *Endocrin* 96: 618-624
- Welshons WV, Nagel SC, Thayer KA, Judy BM, vom Saal FS (1999) Low-dose bioactivity of xenoestrogens in animals: fetal exposure to low doses of methoxychlor and other xenoestrogens increases adult prostate size in mice. *Toxicol Ind Health* 15: 12-25
- White R, Jobling S, Hoare SA, Sumpter JP, Parker MG (1994) Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinology* 135: 175-182
- Williams J, Foster PMD (1988) The production of lactate and pyruvate as sensitive indices of altered rat Sertoli cell function in vitro following the addition of various testicular toxicants. *Toxicol Lett* 47: 249-257
- Williams J, Foster PMD (1989) The effects of 1,3-dinitrobenzene and mono-(2-ethylhexyl) phthalate on hormonally stimulated lactate and pyruvate production by rat Sertoli cell cultures. *Toxicol Lett* 47: 249-257
- Wrobel KH, Bickel D, Kujat R, Schimmel M (1995) Configuration and distribution of bovine spermatogonia. *Cell Tissue Res* 279: 277-289
- Yamagishi T, Miyazaki T, Horii S, Kaneko S (1981) Identification of musk xylene and musk ketone in freshwater fish collected from the Tama River, Tokyo. *Bull Environ Contam Toxicol*. 26(5): 656-62
- Yasuda Y, Ohara I, Konishi H, Tanimura T (1988) Long-term effects on male reproductive organs of prenatal exposure to ethinyl estradiol. *Am J Obstet Gynecol* 159: 1246-1250
- Zhuang GY, Meng-Chung J, Jin LC, Qing YW (1989) The effect of long-term treatment with crude cottonseed oil on pituitary and testicular function in men. *Int J Androl* 12: 404-410

8 Lebenslauf

ANGABEN ZUR PERSON

Name: B i t t o r f, Kathrin, geb. Mihm
geboren: 03.02.1975 in Bad Salzungen
Familienstand: verheiratet, 1 Kind
Nationalität: deutsch

SCHULBILDUNG

09.81 - 08.90 Maxim - Gorki - Oberschule, Dermbach
09.90 - 08.91 Andreas - Fack - Oberschule, Kaltennordheim (Leistungsklasse)
09.91 - 08.93 Gymnasium, Bad Salzungen
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

BERUFLICHER WERDEGANG

09.93 - 08.96 Ausbildung zur Krankenschwester im Klinikum Erfurt
- Abschluss: Krankenschwester -
09.96 - 03.97 Krankenschwester im Klinikum Fulda
04.97 - 05.03 Studium der Medizin
an der Justus - Liebig - Universität Gießen
03.99 Ärztliche Vorprüfung
03.00 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
03.02 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04.02 - 5.03 Praktisches Jahr im Kreiskrankenhaus Bad Hersfeld (Wahlfach:
Gynäkologie und Geburtshilfe)
05.03 Ärztliche Prüfung
06.03 - 10.04 Ärztin im Praktikum in der Frauenklinik des Herz-Jesu-
Krankenhauses in Fulda
10.04 - Assistenzärztin in der Frauenklinik des HJK Fulda

9 Danksagung

Diese Arbeit entstand am Zentrum für Dermatologie und Andrologie der Justus-Liebig Universität, Gießen.

Ich möchte ganz besonders danken Herrn Prof. Dr. Dr. med. habil. W.-B. Schill, Direktor des Zentrums für Dermatologie und Andrologie der Justus-Liebig-Universität, Gießen, für die Überlassung des Themas, die Betreuung sowie die Bereitstellung der Arbeitsmaterialien und Geräte.

Außerdem bin ich Herrn PD Dr. rer. nat. Thomas Monsees zu großem Dank verpflichtet für die Unterstützung und Betreuung während des experimentellen Teils sowie für Anregungen und Verbesserungsvorschläge beim Verfassen dieser Arbeit. An dieser Stelle gilt auch mein Dank Herrn Prof. Dr. rer. nat. Ralf Henkel.

Mein herzlicher Dank gilt Frau G. Thiele, die mir bei der Einarbeitung half und mich bei der Betreuung der Zellkulturen unterstützte.

Den Mitarbeitern des andrologischen Forschungslabors gilt besonderer Dank für ihre Kollegialität und Geduld.

Summary

Environmental pollutants are discussed as a major cause for the observed decline in human sperm counts. In addition, during the last years an increase in the number of infertile couples in industrial nations was observed. An impairment of the morphology or physiology of Sertoli cells could be responsible for this, because these cells are essential for spermatogenesis. Environmental pollutants, e.g. musk ketone or musk xylol, which find wide application in the cosmetics industry, or xenoestrogens such as bisphenol A, ethinylestradiol, and daidzein, seem to play a role. The aim of this work was the development of a test model to examine the effects of these chemicals on the physiology and vitality of Sertoli cells in vitro. The secretions of the carbohydrate lactate and the hormone Inhibin-B were analysed as unspecific metabolic and specific endocrine cell markers, respectively. These experiments were done using Sertoli-cell monocultures which had been isolated from testicles of 18-21 days old Sprague Dawley rats. The substances were dissolved in medium and the cells were incubated for 24 h and 48h (inhibin-B) or 48h and 72h (lactate, vitality). Protein content was determined by the method of Lowry et al. Cytotoxicity was analysed by MTT-Assay using mitochondrial dehydrogenase activity as a marker.

Overall, Sertoli cell viability was not affected after treatment with estrogens. Only daidzein at the highest concentration tested (36 μM) significantly decreased mitochondrial dehydrogenase activity. Ethinylestradiol significantly enhanced lactate production up to 4.3 fold at concentrations of 33 nM or higher. Estradiol or xenoestrogens, however, did not alter lactate levels. Ethinylestradiol caused also a significant rise (up to 72%) in inhibin-B production at concentrations of 330 nM or above. In contrast, the highest concentration of bisphenol A (43 μM) decreased inhibin-B secretion by 24%. Exposure to the other xenoestrogens did not alter inhibin levels. The natural estrogen, estradiol, showed in concentrations from 0.1 - 1000ng/ml (0 – 3.6 μM) no influence on the tested parameters of Sertoli cells. Musk xylol caused a slight dose-dependent increase in lactate production and a weak decrease in inhibin-B levels. On the other hand, musk ketone led to a small drop in lactate secretion.

Summing up, the determination of lactate and inhibin-B levels after exposure to environmental pollutants together with the analysis of cytotoxicity using the MTT assay seems to be a valid tool to investigate the toxic power of a substance concerning the Sertoli cell. The most sensitive parameter seems to be Inhibin-B secretion. The establishment of an in

vitro test system using primary Sertoli cells was done therefore successfully. Practice suitability and time involved kept within the framework of the initial aim formulation.

In conclusion, ethinylestradiol and bisphenol A partly altered Sertoli cell physiology which in turn may affect spermatogenesis. Sertoli cells displayed estrogen receptors. However, neither estradiol nor the xenoestrogens tested affected Sertoli cell functions at the low nM level. Thus, an estrogen receptor-mediated mechanism is unlikely. Therefore, the observed effects on Sertoli cell physiology seem to be non-genomic, e.g. by caused by competitive inhibition of related enzymes.

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“